UNIVERSITE FRANCOIS-RABELAIS

FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

ANNEE 1975 N° 23

THESE

POUR LE

DOCTORAT EN MEDECINE

DIPLOME D'ETAT

PAR

Alain GUILLEMART

Né le 24 mai 1947, à PARIS

Présentée et soutenue publiquement le 24 février 1975

CONCENTRATION DES POLYPHOSPHATES MARQUES DANS LES LESIONS DES TISSUS MOUS APPLICATION A L'ETUDE DES RAMOLLISSEMENTS CEREBRAUX ET DES INFARCTUS DU MYOCARDE

Président de Thèse : Madame le Professeur T. PLANIOL

Membres du Jury : Monsieur le Professeur M. ROUZAUD
Mademoiselle le Professeur M. BROCHIER
Monsieur le Professeur J. CASTAING
Monsieur le Professeur P. JOBARD
Monsieur le Professeur Ag. J. P. MUH

Pays Bas, Leyde

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549621_0004

UNIVERSITE FRANCOIS-RABELAIS

FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

ANNEE 1975 N°

THESE

POUR LE

DOCTORAT EN MEDECINE

DIPLOME D'ETAT

PAR

Alain GUILLEMART

Né le 24 mai 1947, à PARIS

Présentée et soutenue publiquement le 24 février 1975

CONCENTRATION DES POLYPHOSPHATES MARQUES DANS LES LESIONS DES TISSUS MOUS APPLICATION A L'ETUDE DES RAMOLLISSEMENTS CEREBRAUX ET DES INFARCTUS DU MYOCARDE

Président de Thèse : Madame le Professeur T. PLANIOL

Membres du Jury : Monsieur le Professeur M. ROUZAUD
Mademoiselle le Professeur M. BROCHIER
Monsieur le Professeur J. CASTAING
Monsieur le Professeur P. JOBARD
Monsieur le Professeur Ag. J. P. MUH

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UNIVERSITE FRANCOIS-RABELAIS

FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

Doyen	:	Professeur GOUAZE A.
Assesseur	:	Professeur MOURAY H.
Assesseur	:	Professeur BAUDOUIN J.
Secrétaire	:	Monsieur GANNIER J.

DOYENS HONORAIRES

MM. ARDOUIN - FROMENTY - HUC - HUSSENSTEIN - LETELLIER - MERCIER - LIEFFRING.

PROFESSEURS TITULAIRES ET PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

MM.	ARON Emile	Clinique Médicale
	RAYNAUD Robert	Clinique Médicale
	GAUTIER Jacques	Thérapeutique
	BOULARD Pierre	Hygiène et Hydrologie
	LARMANDE Aimé	Clinique Ophtalmologique
	ARNAUD Robert	Bactériologie
	ROUZAUD Marcel	Clinique Neurologique
	GOUAZE André	Anatomie
	REYNAUD Jean	Clinique Oto-Rhino-Laryngologique
	COMBE Paul	Clinique Médicale Infantile
	VANDOOREN Michel	Clinique Chirurgicale Chirurgie Générale A
	THOUVENOT Joseph	Physiologie
	COMBESCOT Charles	Zoologie - Parasitologie
	VARGUES Robert	Bactériologie
	WEILL Jacques	Biochimie
	JOBARD Pierre	Anatomie Pathologique
	GRECO Jean-Marie	Clinique Chirurgicale et Chirurgie Plastique
	MAILLET Marc	Histologie
	RENOUX Gérard	Immunologie
Melle	BROCHIER Mireille	Séméiologie Médicale
Mme	PLANIOL Thérèse	Biophysique
MM.	GENIER Bernard	Maladies infectieuses
	NEEL Jean-Louis	Pathologie Médicale
	SOUTOUL Jean	Clinique Obstétricale et Gynécologique
	BRIZON Jacques	Séméiologie Chirurgicale
	MORAND Philippe	Médecine Générale
	CASTAING Jean	Clinique Chirurgicale Orthopédique
	BERTRAND Jean	Hépato-Gastro-Entérologie
	BARSOTTI Jacques	Chirurgie Générale
	SIZARET Pierre	Psychiatrie
	BAUDOUIN Jean	Pneumo-Phtisiologie

PROFESSEURS SANS CHAIRES

MM. MICHEL Jean	Electroradiologie
FRANCOIS André	Dermatologie et Vénéréologie
LE CHEVALLIER Paul	Phumatologie
LEROUX Maurice	Hématologie
ECARLAT Bernard	Electroradiologie
MOURAY Henri	Biochimie
LELORD Gilbert	Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES ET AGREGES

MM. BAGROS Philippe	Néphrologie
BENATRE André	Anatomie Pathologique
BERGER Christian	Gynécologie-Obstétrique
BESNARD Jean-Claude	Biophysique
BRETEAU Michel	Pharmacologie
CASTELLANI Lucien	Chirurgie Générale
FAUCHIER Claude	Pédiatrie
FLOYRAC Roger	Biophysique
FPOGE Etienne	Médecine Légale et Toxicologie
GROUSSIN Pierre	Médecine Interne
LAFFONT Jacques	Anatomie-Organogénèse
LAMISSE Fernand	Médecine Interne
LAUGIER Jean	Pédiatrie
LEROY Jean	Hématologie
LEROY Georges	Anesthésiologie
MOLINE Jean	Médecine et Chirurgie Expérimentales et comparées
MUH Jean-Pierre	Biochimie
MURAT Jean	Médecine et Chirurgie Expérimentales et comparées
RAYNAUD Philippe	Médecine Interne
PIBADEAU-DUMAS J.Louis	Neurologie
ROLLAND Jean-Claude	Pédiatrie A
ROSSAZZA Christian	Ophtalmologie
SAINDELLE Anatole	Physiologie
SANTINI Jean-Jacques	Anatomie-Organogénèse
THAPANNE Michel	Histologie
TOUMIEUX Bernard	Chirurgie Générale A

AVANT-PROPOS

Le diagnostic de nature des lésions focalisées des tissus mous nécessite, en médecine nucléaire, pour progresser, de faire appel à des indicateurs radioactifs de plus en plus spécifiques. Le pyrophosphate technétié, employé dès 1971 pour l'exploration isotopique du squelette, se concentre également dans certaines lésions ischémiques, ce qui nous a conduit logiquement à étudier son métabolisme.

Madame le Professeur PLANIOL nous a incité à prendre part, dans son service, aux travaux effectués dans ce domaine. Elle nous a dirigé vers l'étude des ramollissements cérébraux et des infarctus du myocarde à l'aide du pyrophosphate marqué au technétium.

Au moment de clore cette première étape de nos recherches, nous désirons exprimer toute notre gratitude à tous ceux qui nous ont guidé, conseillé, soutenu et aidé.

Qu'il nous soit permis de remercier Madame le Professeur PLANIOL. Il nous est difficile d'exprimer tout ce que nous devons à sa science et à sa bonté, mais nous voudrions qu'elle soit assurée de notre plus profonde gratitude. Sans ses conseils et les moyens techniques qu'elle mit à notre disposition, nous n'aurions pu réaliser ce travail.

Monsieur le Professeur ROUZAUD, dans le service duquel nous avons eu une fructueuse prise de contact avec la neurologie,

Monsieur le Professeur JOBARD, avec l'équipe duquel nos voies de recherche se sont élargies,

Monsieur le Professeur agrégé MUH, qui nous a prodigué ses conseils éclairés et nous a guidé avec bienveillance,

Monsieur le Professeur CASTAING et Mademoiselle le Professeur BROCHIER, qui nous font le grand honneur d'accepter de juger ce travail,

nous les prions de croire à nos sentiments de plus profonde gratitude,

PLAN

CHAPITRE INTRODUCTIF : 1

CHAPITRE PREMIER : 5
Caractères généraux des dérivés phosphorés

CHAPITRE DEUXIEME : 21
Rôle régulateur du pyrophosphate dans le métabolisme phosphocalcique des espaces extracellulaires

CHAPITRE TROISIEME : 43
Fonctions cellulaires et métabolisme phosphocalcique dans le tissu sain et lors d'hypoxies ou d'ischémies tissulaires

CHAPITRE QUATRIEME : 75
Exploration isotopique des accidents vasculaires cérébraux et myocardiques

CHAPITRE CINQUIEME : 95
Résultats obtenus dans l'exploration cérébrale et myocardique

CONCLUSIONS : 115

CHAPITRE INTRODUCTIF

D'une manière générale, les traceurs, colorés ou radioactifs, sont destinés à rendre compte du comportement de l'organisme à leur égard, dans les conditions particulières d'administration, de délai et de prélèvement propres à chaque examen. L'application clinique des traceurs s'est considérablement améliorée par l'utilisation de radioéléments émetteurs gamma. En effet, les propriétés énergétiques du rayonnement émis autorisent une détection à distance.

Le traceur peut être un corps simple dont il y a intérêt à suivre le métabolisme (iode radioactif par exemple). Pour un grand nombre de problèmes cliniques on s'adresse soit à des molécules, soit à des particules dont le cheminement est repérable grâce à une "étiquette" radioactive. La molécule peut être "marquée" par un radioélément remplaçant un atome constitutif de la molécule, ou par un radioélément étranger fixé sur elle par une liaison plus ou moins forte. On obtient ainsi un produit radiopharmaceutique dont le comportement *in vivo* dépend d'une part du métabolisme de la molécule marquée, d'autre part de la stabilité de la liaison. La captation préférentielle du produit par un organe permet l'étude morphologique et fonctionnelle de celui-ci. Un diagnostic positif de lésion repose sur un trouble de fixation par l'organe ; un diagnostic de nature se base sur l'analyse physiopathologique des désordres observés.

C'est en 1971, que Subramanian propose certains polyphosphates pour l'exploration du squelette : ce sont des complexes de polyphosphates d'étain et de technétium. La grande affinité des polyphosphates pour le tissu osseux et les propriétés physiques très favorables du technétium 99m font de ces composés un groupe de produits radiopharmaceutiques de choix pour les études morphologiques du squelette. Les remaniements ostéogéniques ou ostéolytiques se manifestent par une hyperfixation du traceur. Cependant, bien que les résultats obtenus en pathologie osseuse soient très encourageants, il est apparu progressivement que les dérivés phosphorés pouvaient également se concentrer en dehors du tissu osseux. Après avoir été considérée initialement comme une gêne pour l'interprétation des scintigraphies osseuses, cette concentration préférentielle des dérivés phosphorés dans certains tissus mous pathologiques est maintenant source de nouveaux espoirs. En effet, une spécificité relative pour certains types de lésions, pourrait, dans un contexte clinique déterminé, orienter d'emblée vers le diagnostic de nature de la lésion. Dans cette optique, des hyperfixations par différents tissus pathologiques ont été décrites. C'est le cas des lésions nécrotiques d'origine ischémique du tissu cérébral (Grames et coll., 1973) et du myocarde (Bonte et coll., 1974a).

Pour comprendre le mécanisme des hyperfixations par les tissus mous, il nous a paru nécessaire d'étudier d'abord les mécanismes de fixation au niveau de l'os normal et pathologique. Le rôle physiologique du pyrophosphate n'est pas encore complètement élucidé ; sa participation au processus de calcification a néanmoins été démontrée. De plus, le rôle des phosphatases, alcalines notamment, est connu de longue date, et il a été prouvé plus récemment

qu'elles possèdent des propriétés non seulement estérasiques mais aussi pyrophosphatasiques. Cependant beaucoup de points restent encore obscurs, surtout pour ce qui concerne les relations pouvant exister entre le métabolisme du pyrophosphate et les lésions des tissus mous.

Le but du présent travail est d'approfondir les possibilités offertes par le pyrophosphate pour l'exploration des lésions cérébrales et myocardiques, compte tenu des données fondamentales recueillies sur ce type de produits. En premier lieu, nous rappellerons donc les bases biologiques de l'utilisation des dérivés phosphorés en médecine nucléaire, en insistant principalement sur les mécanismes impliqués au niveau du squelette. Puis nous considérerons la physiopathologie des ischémies cérébrale et myocardique, et nous nous référerons alors d'une part aux données de l'utilisation des traceurs traditionnels dans ces deux territoires, d'autre part aux conséquences métaboliques et tissulaires de l'anaérobiose. Enfin, nous analyserons les résultats cliniques obtenus avec le pyrophosphate stanno-technétié au niveau cérébral (à propos de 56 cas) et au niveau myocardique (à propos de 21 cas).

CHAPITRE PREMIER

I - LES DERIVES PHOSPHORES
- 1. Les polyphosphates inorganiques
- 2. Les polyphosphonates

II - LES PRODUITS RADIOPHARMACEUTIQUES
- 1. Les complexes stannotechnétiés
- 1.1 - Préparation des complexes
- 1.2 - Composition du complexe PP-Sn-^{99m}Tc
- 2. Les isotopes utilisés
- 2.1 - Le technétium 99m
- 2.2 - Le phosphore 32
- 2.3 - Les autres isotopes

III - CINETIQUE ET DISTRIBUTION *IN VIVO*
- 1. Caractères généraux
- 2. Cinétique des traceurs
- 2.1 - ^{32}(PP) non complexé
- 2.2 - Les complexes stannotechnétiés
- 3. Distribution dans l'organisme
- 3.1 - Distribution des molécules non complexées
- 3.2 - Distribution des complexes stannotechnétiés
- 3.3 - Stabilité des complexes stannotechnétiés *in vivo*

IV - TOXICITE DES COMPLEXES STANNOTECHNETIES

V - DOSIMETRIE DES COMPLEXES MARQUES PAR ^{99m}Tc

VI - CONCLUSIONS

CHAPITRE PREMIER

CARACTERES GENERAUX DES DERIVES PHOSPHORES.

I. LES COMPOSES PHOSPHORES.

Elément essentiel de la vie, l'orthophosphate est un anion oxygéné du phosphore dans lequel celui-ci est à l'état d'oxydation + 5.

In vivo, il se combine avec de nombreux alcools ou polyols pour former des esters phosphoriques. Les phosphatases sont des estérases capables d'hydrolyser la liaison "C-O-P" de ces esters. Autre métabolite important, l'anion pyrophosphate est un diphosphate dont la caractéristique principale est une liaison "P-O-P". De nombreuses réactions de l'anabolisme cellulaire produisent du pyrophosphate dont l'hydrolyse est catalysée par une pyrophosphatase.

In vitro, de nombreux composés nouveaux peuvent être synthétisés. Dans le cadre de cette étude nous nous limiterons à deux groupes de dérivés oxygénés, les polyphosphates inorganiques(*) et les polyphosphonates. L'étude comparative de ces deux séries de corps est en effet riche d'enseignements pour la compréhension des processus physiologiques.

---

* Les polyphosphates existent également à l'état naturel, mais uniquement dans certains microorganismes (Harold, 1966).

1. Les polyphosphates inorganiques.

Ce sont des polymères condensés d'orthophosphates. Les différentes unités sont réunies entre elles par des liaisons "P-O-P" et la structure réalisée peut être linéaire, ramifiée ou cyclique selon les conditions de synthèse. Le plus simple de ces polymères est le pyrophosphate : il ne comprend que deux unités. Dans ce qui suit, nous désignerons par PP le dimère et par PYP les polymères dont le nombre d'unités est supérieur à deux.

2. Les polyphosphonates.

Ce sont des composés organiques renfermant des liaisons "C-P". Nous nous intéresserons plus particulièrement aux diphosphonates car leur structure de base est "P-C-P". L'analogie avec la liaison "P-O-P" du pyrophosphate est certaine et fait tout l'intérêt de ces composés. Tout en conservant des propriétés biologiques comparables à celles du pyrophosphate, ils résistent mieux à la dégradation chimique et enzymatique. Le dérivé le plus simple est le méthylène diphosphonate (MDP), mais c'est l'éthane 1 - hydroxy 1,1 - diphosphonate (EHDP) qui est le plus communément utilisé chez l'homme.

II. LES PRODUITS RADIOPHARMACEUTIQUES.

1. Les complexes stannotechnétiés.

1.1. PREPARATION DES COMPLEXES.

On peut réaliser des complexes stannotechnétiés aussi bien avec les polyphosphates qu'avec les diphosphonates. Il s'agit d'une méthode générale de marquage de molécules par le technétium 99m. Celui-ci est réduit à l'état d'oxydation + 4 par l'étain stanneux. Le rapport molaire du composé phosphoré à l'étain doit se situer entre 20 : 1 et 50 : 1 pour obtenir les meilleures fixations osseuses (Subramanian, 1974). La dose injectée de complexe d'étain varie de 0,05 à 0,5 mg/kg.

Le pyrophosphate stannotechnétié (PP-Sn-^{99m}Tc) que nous utilisons est préparé selon une méthode décrite par Hégesippe et coll., (1973).:

1,3mg de chlorure d'étain ($SnCl_2$, $2H_2O$) en solution chlorhydrique 0,5 N est ajouté à 100 mg de pyrophosphate de sodium ($P_2O_7Na_4$, $10H_2O$) en solution aqueuse. La solution est amenée à pH 6,2, à l'aide de soude.

La préparation du complexe radioactif doit être réalisée extemporanément. Pour cela, il suffit d'ajouter 20 à 25 mCi de pertechnétate. Le marquage est

immédiat et total. Aucune étape de purification n'est requise. Pour garantir la stabilité du complexe, la préparation doit se faire en atmosphère d'azote. Jusqu'au moment de l'injection, le contact avec l'oxygène de l'air doit être proscrit.

1.2. COMPOSITION DU COMPLEXE PP.Sn.^{99m}Tc.

La réaction de réduction du technétium par le mélange "diphosphate disodique d'étain - diphosphate tétrasodique" produit plusieurs composés qui coexistent dans la solution injectable. Leur structure chimique précise est encore mal connue. Dans ces complexes l'étain demeurerait à l'état d'oxydation + 2.

2. Les isotopes utilisés.

2.1. LE TECHNETIUM 99m.

L'intérêt clinique des complexes stanno-technétiés réside dans les propriétés physiques du rayonnement gamma émis par le technétium 99m. Cet isotope, produit de filiation du molybdène 99, se caractérise par :

- une courte période physique (6,05 h), réduisant la durée d'irradiation du patient.
- un mode de désintégration par transition isomérique.

Il émet un rayonnement gamma de 142 keV (1,4 pour cent) et deux rayonnements gamma (98,6 pour cent) de 2 et 140 keV. Cette dernière énergie

est donc l'énergie principale.

Des rayons gamma en proportion non négligeable (11 pour cent) transfèrent par conversion interne leur énergie à des électrons des couches K, L et M, qui sont émis sous forme d'un spectre de raies. Secondairement, les rayons X de réarrangement donnent naissance à des électrons Anger dont les plus nombreux ont une énergie de 1,9 et 0,4 keV (Dillman, 1969).

Ces électrons faiblement énergétiques rendent possible la réalisation d'autoradiographies dont la résolution est excellente. Pour les explorations *in vivo* on utilise le rayonnement gamma de 140 keV qui offre l'avantage d'être détectable en profondeur (couche de demi-absorption de 46 mm dans les tissus mous) avec un appareillage relativement léger (couches de demi-absorption dans l'iodure de sodium et le plomb respectivement de 3,2 mm et 0,3mm)

2.2. LE PHOSPHORE 32.

La substitution par ^{32}P d'un atome stable de phosphore a été le premier mode de marquage proposé pour les ions orthophosphates et polyphosphates. Ces molécules diffèrent des complexes stannotechnétiés car le caractère ionique du polyphosphate est totalement conservé.

Le phosphore 32 émet un rayonnement bêta pur de 1710 keV dont le parcours maximum dans les tissus mous est de 7 mm. Il a donc peu d'applications en clinique comme traceur. Par contre, sa période physique est suffisamment longue (14,3 j) pour en faire un indicateur intéressant dans les études *in vitro* et l'expérimentation animale.

2.3. LES AUTRES ISOTOPES.

Des techniques de double marquage ont été proposées expérimentalement pour déterminer la stabilité des complexes stannotechnétiés (Yano et coll., 1973 ; Tofe et Francis, 1974).

L'étain 113 est alors intéressant à employer. Il émet par capture électronique un rayonnement gamma de 255 keV. Sa période est de 119 jours et son descendant, l'indium 113m, est également émetteur gamma, par transition isomérique, d'un rayonnement de 392 keV et de demi-vie 100 mn.

Pour mémoire, citons encore l'étain 119m et le carbone 14 qui ont été utilisés par d'autres auteurs.

III. CINETIQUE ET DISTRIBUTION *IN VIVO*.

1. Caractères généraux.

Après administration intraveineuse, les différents composés oxygénophosphorés ont une répartition dans l'organisme qui se caractérise par :

- une importante fixation osseuse.
- une faible fixation dans les tissus mous, à l'exception des reins.
- une clearance sanguine rapide.
- une élimination urinaire importante.

Le comportement *in vivo* est assez semblable d'un complexe stannotechnétié à l'autre. Par contre, chaque complexe se différencie sensiblement de la molécule homologue non complexée à l'étain et au technétium. De plus, les polyphosphates se comportent différemment de l'orthophosphate (P).

2. Cinétique des traceurs.

2.1. ^{32}(PP) NON COMPLEXE.

Jung et coll. (1970) ont étudié chez le chien le turn-over de ^{32}(PP). Après injection intraveineuse rapide de cette molécule, l'activité plasmatique a une décroissance biexponentielle. Appliquant les techniques de l'analyse compartimentale, un modèle à deux compartiments ouverts est suggéré. Le premier compartiment représente le secteur plasmatique et la demi-vie du pyrophosphate y est de 1 à 3 minutes. ^{32}(PP) disparaît de ce compartiment soit par excrétion rénale (4 à 11 pour cent) soit par hydrolyse (16 à 22 pour cent) soit enfin par passage dans le deuxième compartiment. La signification de ce dernier est imprécise et il est improbable qu'il représente, dans ce modèle, le tissu osseux car son "volume" est trop faible.

L'hydrolyse de ^{32}(PP) en ^{32}(P) est 10 à 100 fois plus importante *in vivo* que lors d'un mélange *in vitro* avec du sang total. Il faut donc conclure que l'hydrolyse *in vivo* n'est pas limitée au courant sanguin. De même, une partie du ^{32}(PP) fixée sur les reins apparaît dans les urines sous forme de ^{32}(P), ce qui suggère qu'une hydrolyse a lieu dans les reins. Des résultats comparables ont été obtenus, chez le lapin, par Subramanian et coll. (1971) avec ^{32}(PYP) : dans les jours qui suivent l'administration, une grande partie de la radioactivité urinaire est sous forme de ^{32}(P).

2.2. LES COMPLEXES STANNOTECHNETIES.

Les résultats publiés ne sont pas entièrement concordants, même lorsqu'ils concernent des préparations identiques. Tous les auteurs admettent

bien une décroissance biexponentielle, voire triexponentielle, du traceur, mais avec des chiffres de périodes biologiques très différents : entre 5 et 15 minutes dans le premier compartiment, 60 et 300 minutes dans le deuxième. Les facteurs de variabilité sont nombreux :

- multiplicité des espèces animales utilisées.
- animaux de tous âges. Castronovo et coll. (1972) ont analysé, chez le lapin, les modifications de la clearance sanguine d'EHDP-Sn-Tc en fonction de l'âge de l'animal. Ils constatent que la clearance est d'autant plus rapide que l'animal est plus jeune.
- différences dans le modes de préparation d'un même composé selon les auteurs. Ainsi, le pH, le rapport molaire entre composé et chlorure d'étain interviennent de façon significative sur la répartition *in vivo* du traceur, ce qui nous semble en faveur de la présence de plusieurs complexes dans chaque préparation.
- doses injectées non toujours rapportées au poids de l'animal. Eckelman et coll. (1974) ont étudié, chez le lapin, les variations dans la distribution de PP-Sn-Tc en fonction de la quantité de traceur injectée. A des doses trop élevées, la fixation osseuse diminue alors que la fixation hépatique augmente, ce qui peut être une conséquence de la formation de colloïdes de pyrophosphates.
- liaison possible du composé aux protéines plasmatiques. Ainsi, une heure après l'injection, les polyphosphates ou le pyrophosphate se lient deux fois plus aux protéines que les diphosphonates (Subramanian et coll., 1974).
- poids moléculaires non identiques. Les polyphosphates de poids moléculaire élevé (supérieur à 8000) peuvent également former des colloïdes et possèdent, de ce fait, une affinité accrue pour le système réticulo-endothélial,dont celui du foie.

A partir des courbes de clearances sanguines, Yano et coll. (1973) ont calculé, grâce à un modèle mathématique compartimental, une clearance osseuse du traceur. Ils ont appliqué cette méthode à l'étude comparative des clearances osseuses du fluor 18 et de EHDP-Sn-Tc. La clearance osseuse moyenne, chez le chien, est de 20 pour cent pour EHDP-Sn-Tc, lorsqu'on fixe la clearance de ^{18}F à 100 pour cent.

3. Distribution dans l'organisme.

3.1. DISTRIBUTION DES MOLECULES NON COMPLEXEES.

Les études ont été faites chez la souris après injection intrapéritonéale des traceurs et sacrifice de l'animal 24 heures après la dernière dose. Par ce protocole, Fels et coll. (1959) ont comparé les distributions de $^{32}(P)$, de triphosphate ($^{32}(PPP)$) et de $^{32}(PYP)$ (renfermant plus de 3 unités phosphatées). Au niveau du fémur, les activités de $^{32}(PPP)$ et de $^{32}(PYP)$ sont respectivement 1.8 et 1.4 fois celles de $^{32}(P)$. Les rapports d'activités dans l'os et les tissus mous sont de 3.5 pour $^{32}(P)$, 5 pour $^{32}(PPP)$ et 8.2 pour $^{32}(PYP)$. Ces auteurs constatent donc une concentration importante des trois molécules dans l'os, moins marquée cependant pour l'orthophosphate.

Avec un protocole semblable, Anghileri et Miller (1972) comparent les distributions *in vivo* de $^{32}(P)$ et de $^{32}(PYP)$, ce dernier pouvant être sous forme linéaire ou ramifiée. Pendant les 24 premières heures, les trois traceurs se concentrent préférentiellement dans l'os, et les formes ramifiées et linéaires donnent à l'os une radioactivité comparable. Par contre, entre le premier et le huitième jour

suivant l'injection, la radioactivité osseuse due à la forme ramifiée diminue de moitié ou plus, tandis que la concentration radioactive osseuse ne varie pas lorsque la forme est linéaire. L'analyse d'extraits tissulaires montre que la radioactivité est principalement due à des ions orthophosphate et pyrophosphate, mais que ceux-ci se forment plus vite et en quantité plus importante lorsque le traceur est ^{32}(PYP) linéaire. En conséquence, il est suggéré qu'une susceptibilité différente des formes linéaires et ramifiées à l'égard de l'hydrolyse enzymatique peut expliquer les variations de leur distribution *in vivo*. L'hydrolyse de ^{32}(PYP) linéaire serait rapide et complète alors que celle de ^{32}(PYP) ramifié produirait des polymères intermédiaires qui ne seraient pas dégradés mais excrétés dans les urines.

3.2. DISTRIBUTION DES COMPLEXES STANNOTECHNETIES.

Comme pour les études cinétiques, les résultats publiés sont assez variables. On n'observe cependant pas de différences notables entre complexes de polyphosphates (linéaires) et diphosphonates. Dans l'ensemble, trois heures après injection intraveineuse, l'activité se répartit dans l'organisme comme suit :

Ensemble des os	: 50	à 55	p. cent	de la dose injectée	
(fémur	: 1	à 2	"	"	)
Urines	: 40	à 45	"	"	
Sang	: 3	à 5	"	"	
Foie	: 1	à 4	"	"	
Ensemble des muscles	: 1	à 2	"	"	
Reins	: 0,8	à 1,5	"	"	
Moëlle osseuse	: 0,5	à 1	"	"	

Les rapports d'activité entre os et autres organes sont donc plus élevés avec les complexes stannotechnétiés qu'avec les molécules de polyphosphates marquées par ^{32}P.

3.3. STABILITE DES COMPLEXES STANNOTECHNETIES *in vivo*.

Tofe et Francis (1972) ont évalué *in vivo* la stabilité des complexes EHDP-Sn-Tc. Ils ont, pour cela, réalisé un triple marquage : ^{14}C-EHDP-^{113}Sn-^{99m}Tc. Le rapport ^{14}C-EHDP/^{99m}Tc mesuré sur des fragments osseux est de 1,2 et demeure stable au cours du temps. Ceci est en faveur de l'absence d'hydrolyse *in vivo* du complexe.

Bowen et Garnett (1974) ont étudié deux autres complexes, PYP-Sn-Tc et PP-Sn-Tc, par chromatographie d'échantillons sanguins et urinaires d'origine humaine. PYP-Sn-Tc est hydrolysé *in vivo* et la radioactivité se retrouve dans l'urine sous forme de PP-Sn-Tc, alors que PP-Sn-Tc reste stable dans le sang et l'urine.

IV. TOXICITE DES COMPLEXES STANNOTECHNETIES.

L'étain et la molécule marquée constituent, à fortes doses, deux substances toxiques pour l'organisme.

La plupart des préparations à usage humain renfermant moins de 1 mg d'étain stanneux, ce qui correspond à une dose inférieure à 0,015 mg/kg pour un adulte de 70 kg. McRae et coll. (1974) observent, après injection intraveineuse à des rats, une mortalité de 50 pour cent des sujets en moins de deux semaines pour des doses de 12 mg Sn (II)/kg. Les lésions sont constituées par un oedème du tissu rétropéritonéal, une turgescence rénale et parfois des

hémorragies rétropéritonéales et intrapleurales. Une perte de poids sévère et une mortalité de 10 pour cent des sujets en deux semaines est constatée avec une dose de 8 mg Sn(II)/kg. Aucune lésion n'a été décelée avec des doses inférieures à 2 mg Sn(II)/kg.

L'évaluation de la toxicité des composés phosphorés et de leurs complexes stannotechnétiés donne lieu à controverse. Certains auteurs situent la DL50 de ces corps entre 100 et 500 mg/kg alors que d'autres la considèrent comme variant entre 30 et 50 mg/kg.

Ainsi, pour Cohen et coll. (1972), la DL50 du pyrophosphate de sodium stable est de 72,5 mg/kg chez la souris. Par contre, Stevenson et coll. (1974), évaluant l'effet léthal dans les cinq minutes qui suivent l'injection intraveineuse rapide du composé, constatent une DL50 de 45 mg/kg pour PP-Sn-^{99m}Tc chez le rat.

Subramanian et coll. (1973) estiment la DL50 des polyphosphates linéaires stannotechnétiés à 100 mg/kg chez la souris et le lapin. Par contre, Stevenson et coll. (1974) situent la DL50 à 29 mg/kg chez le rat, pour des polyphosphates d'un poids moléculaire de 1400.

Castronovo et Callahan (1973) estiment la DL50 de EHDP-Sn-Tc à 100 - 200 mg/kg chez la souris. Par contre, Stevenson et Dunson (1973) évaluent la DL50 d'un complexe stannotechnétié de diphosphonate à 45 mg/kg chez le rat, le lapin et le chien. Subramanian et coll. (1973) confirment ces résultats avec une DL50 pour EHDP-Sn-Tc de 45-50 mg EHDP/kg chez la souris et de 40-45 mg EHDP/kg chez le lapin adulte.

Sur les plans chimique et biologique, l'apparition de troubles de la calcémie après injection intraveineuse de n'importe lequel de ces

composés est l'élément essentiel. Mais les polyphosphates paraissent s'opposer aux diphosphonates ; les premiers provoqueraient une hypocalcémie et les seconds une hypercalcémie.

L'hypercalcémie, après injection de diphosphonates, est observée quelle que soit la dose administrée et s'accompagne d'une hyperphosphorémie (Jowsey et coll., 1970 ; Russel et Smith, 1973). Le mécanisme exact de sa survenue est ignoré.

L'hypocalcémie constatée après injection de polyphosphates est mieux expliquée. Après administration de PP-Sn-^{99m}Tc à des rats, Stevenson et coll. (1974) constatent une chute significative de la calcémie à partir de 20 mg/kg. L'hypocalcémie concerne à la fois la fraction ionisée et la fraction liée aux protéines. Sur l'électrocardiogramme, un allongement de Q-T apparaît pour des doses moindres (12 mg/kg), tandis que les signes cliniques de tétanie ne s'observent qu'à des doses plus élevées (21 mg/kg).

Ces constatations sont à rapprocher de celles faites par d'autres auteurs après perfusion d'orthophosphates. Ainsi, Hebert et coll. (1966) étudient le mécanisme de l'hypocalcémie secondaire à une perfusion d'orthophosphates chez des sujets normaux, des hypoparathyroïdiens et des hyperthyroïdiens. Ces auteurs ont montré que cette hypocalcémie était en relation étroite avec le produit de solubilité du phosphate de calcium. La précipitation de sels phosphocalciques est donc vraisemblable, mais reste de localisation imprécise. Plus récemment, une minéralisation osseuse accrue a été proposée comme mécanisme de l'hypocalcémie (Reynolds, 1970).

Une acidose métabolique secondaire à l'injection intraveineuse de polyphosphates de sodium a été décrite. Le mécanisme en serait une hydrolyse du composé libérant de l'acide phosphorique.

Stevenson et coll. (1974) n'ont pu mettre en évidence une telle acidose après injection de PP-Sn-^{99m}Tc. Ceci constituerait donc une preuve supplémentaire en faveur de l'absence d'hydrolyse *in vivo* de ce complexe.

Les effets du pyrophosphate, des polyphosphates et diphosphonates sur le métabolisme osseux et la minéralisation seront discutés dans le chapitre deuxième.

V. DOSIMETRIE DES COMPLEXES MARQUES PAR ^{99m}Tc.

Les estimations faites dépendent de la cinétique et de la distribution du traceur. Supposant une période effective de 0,25 jour au niveau de l'os et de 0,083 jour au niveau des reins et de la vessie, une fixation osseuse de 30 pour cent de la dose injectée à 3 heures et une excrétion rénale de 70 pour cent, Yano et coll. (1973) estiment que 10 mCi de complexe stannotechnétié (^{99m}Tc) délivrent chez un adulte de 70 kg les doses suivantes :

organisme entier	$D_{\beta,\gamma}$	= 0,15 rad
vessie		= 7,4 "
reins		= 3,7 "
squelette		= 0,3 "

Supposant une fixation osseuse plus importante (50 pour cent de la dose administrée), Castronovo et coll. (1972) estiment que 10 mCi de complexe irradient de la façon suivante :

organisme entier	$D_{\beta,\gamma}$	= 0,11 rad
vessie		= 4,1 "
reins		= 0,1 "
squelette		= 0,45 "
gonades		= 1,3 "
moëlle osseuse		= 0,1 "

VI. CONCLUSIONS.

Les propriétés du pyrophosphate, produit par le métabolisme cellulaire, sont à l'origine de l'étude de deux séries de composés synthétiques présentant une certaine analogie de structure. Les polyphosphates renferment une liaison "P-O-P" hydrolysable par des pyrophosphatases, tandis que les diphosphonates renferment une liaison "P-C-P" résistante à l'action enzymatique.

La technique de marquage de ces composés par le technétium consiste à réaliser des complexes en présence d'étain stanneux. Ces complexes ont une concentration préférentielle dans le tissu osseux. Le pyrophosphate stannotechnétié paraît stable *in vivo* alors que l'ion pyrophosphate est hydrolysé par des enzymes. La susceptibilité du pyrophosphate à l'égard de l'activité enzymatique semble donc dépendre du type de liaison contracté par ses fonctions acides.

CHAPITRE DEUXIEME

I - LE METABOLISME OSSEUX

II - LA CALCIFICATION

1. Rappel historique
2. Actions du pyrophosphate et de ses homologues sur les cristaux d'hydroxyapatite

2.1 - Actions du pyrophosphate

2.2 - Actions des homologues du pyrophosphate

2.3 - Conclusions

3. Le processus de minéralisation dans l'os normal

3.1 - La minéralisation

3.2 - Les remaniements osseux

III - LE PYROPHOSPHATE ET LA REGULATION PHOSPHOCALCIQUE DES ESPACES EXTRACELLULAIRES

1. Effets du pyrophosphate sur la composition ionique du milieu extracellulaire
2. Pyrophosphate et activité pyrophosphatasique

2.1 - Pyrophasphatase et phosphatases

2.2 - Mécanismes de régulation de l'activité pyrophosphatasique par les cations divalents

IV - ROLE PROTECTEUR DU PYROPHOSPHATE ET DE SES HOMOLOGUES DANS LA MINERALISATION DES TISSUS MOUS

V - CONCLUSIONS

CHAPITRE DEUXIEME

ROLE REGULATEUR DU PYROPHOSPHATE DANS LE METABOLISME PHOSPHOCALCIQUE DES ESPACES EXTRACELLULAIRES.

Le pyrophosphate est libéré par de nombreuses réactions intéressant tous les métabolismes. De ce fait, il occupe une place importante en biochimie. Il est également connu depuis longtemps dans l'industrie et utilisé pour éviter la précipitation des sels de calcium, et notamment du carbonate de calcium, dans les systèmes d'adduction d'eau (Reitemeyer et Bueher, 1940). Son rôle physiologique est néanmoins resté longtemps obscur. Au cours des quinze dernières années, plusieurs auteurs, et en particulier Fleisch, ont démontré *in vitro* le rôle inhibiteur du pyrophosphate et de ses homologues sur la formation, la croissance et la dissolution des cristaux d'hydroxyapatite. *In vivo*, l'intérêt de ces composés provient de la mise en évidence dans les urines et le plasma de pyrophosphate à l'état de traces, mais en concentration suffisante pour avoir un effet inhibiteur sur la minéralisation. Les applications cliniques sont déjà nombreuses. En témoignent les succès obtenus avec les diphosphonates dans le traitement des myosites ossifiantes, et l'usage de plus en plus répandu des dérivés technétiés pour le dépistage des lésions osseuses.

Une étude du rôle physiologique du pyrophosphate est donc amplement justifiée. Celle-ci est orientée vers la connaissance du métabolisme osseux et du mécanisme de la calcification.

I. LE METABOLISME OSSEUX.

Le squelette n'est pas uniquement un organe de soutien ; il participe aussi à de nombreux processus métaboliques. Le rôle de charpente est assuré par le dépôt ordonné de sels minéraux d'hydroxyapatite sur une trame conjonctive. Les échanges métaboliques sont sous la dépendance de processus de destruction et de renouvellement constants qui constituent le remaniement osseux.

Durant la croissance, l'os se forme à partir du cartilage produit par les cellules cartilagineuses. Différent est le processus de remaniement de l'os compact. Celui-ci est déclenché par l'activité ostéolytique des ostéoclastes qui creusent des cavités de résorption. Lors de la destruction, le tissu conjonctif et les sels minéraux disparaissent simultanément. Les cavités sont ensuite comblées par une matrice conjonctive riche en collagène produite par les ostéoblastes. Le tissu ostéoïde ainsi formé se minéralise dans une seconde phase, mais ce processus est assez lent, de sorte que le tissu osseux de formation récente contient moins de sels minéraux que le tissu ancien (Fourman et Royer, 1970).

II. LA CALCIFICATION.

1. Rappel historique.

Les mécanismes responsables de l'accumulation de sels minéraux dans le tissu osseux et les tissus mous pathologiques sont encore mal connus. La première explication biochimique de la minéralisation a été proposée par Robison (1923). Cette théorie attribue à la phosphatase alcaline de l'os le rôle essentiel dans la précipitation du phosphate tricalcique, constituant majeur des sels osseux : elle repose sur trois notions :

1 - La précipitation du phosphate tricalcique dépend de son produit de solubilité S. Elle a lieu lorsque le produit des concentrations ioniques en calcium et phosphates dépasse S.

2 - Les concentrations en calcium et phosphates du plasma, du liquide extracellulaire et du liquide interstitiel prélevé dans le cartilage ossifiable (Howell et coll., 1968) sont trop basses pour déclencher spontanément la précipitation ; elles sont cependant suffisamment élevées pour entretenir la croissance des cristaux d'hydroxyapatite, et de ce point de vue, le liquide extracellulaire est sursaturé.

3 - *In vivo*, la formation des cristaux nécessite localement la présence d'un mécanisme inducteur. Dans la théorie de Robison, la phosphatase alcaline libère *in situ* des ions orthophosphates aux dépens d'esters phosphoriques et déplace ainsi l'équilibre de solubilité.

Cependant les reins, l'intestin, le placenta qui ont normalement une activité phosphatasique

élevée ne se calcifient pas. De même, au niveau de l'os, l'activité phosphatasique est plus élevée à un stade qui précède la calcification. Enfin, la théorie de Robison suppose que les phosphates osseux proviennent d'esters phosphoriques. Or, la quantité disponible dans le liquide extracellulaire en esters est très faible. Harris puis Gutman démontrent que l'action de la phosphatase ne s'exerce pas sur des esters plasmatiques, mais qu'il existe un mécanisme local générateur d'esters phosphoriques à partir du glycogène du cartilage. La glycogénolyse phosphorylative serait donc le processus essentiel de la phase préparatoire de la minéralisation.

Les résultats de Robison et Gutman ne fournissent pas une explication complète de tout le processus de la calcification. Ainsi, des coupes de cartilage demeurent ossifiables *in vitro*, même après destruction de toute activité enzymatique. Il existe donc dans la matrice organique du cartilage une substance capable de déclencher la calcification. Le liquide extracellulaire étant sursaturé en calcium et phosphates la théorie de l'épitaxie suggère la présence d'un "germe" qui jouerait le rôle de substance nucléante et induirait la précipitation des cristaux. Le collagène a des propriétés épitactiques. Fleisch et Neuman (1961) ont démontré que le produit ionique nécessaire à la formation de cristaux est abaissé en présence de collagène, et les concentrations en calcium et phosphates du milieu ambiant avoisinent alors celles des liquides extracellulaires. Les études *in vitro* ont montré que le collagène osseux n'était pas la seule substance nucléante de l'organisme. Les mucopolysaccharides du tissu osseux, le collagène des tissus mous et l'élastine ont cette propriété. Ainsi, il faut expliquer non seulement pourquoi le collagène osseux se calcifie, mais également pourquoi d'autres collagènes ne se calcifient pas. L'existence d'un inhibiteur

jouant le rôle de protecteur du collagène contre la minéralisation a donc été pressentie. La disparition de l'inhibiteur serait indispensable au déclenchement du processus de calcification.

L'identification du pyrophosphate comme inhibiteur possible de la minéralisation résulte des travaux de Fleisch et Russel.

2. Actions du pyrophosphate et de ses homologues sur les cristaux d'hydroxyapatite.

2.1. ACTIONS DU PYROPHOSPHATE.

Le pyrophosphate est présent dans le plasma et les urines à très faible concentration (respectivement 10^{-6} à 10^{-5} M/l et 10^{-5} à 10^{-4} M/l) (Fleisch et Bisaz, 1962).

A ces taux, il inhibe *in vitro* la cristallisation du phosphate de calcium en présence de collagène (Fleisch et Neuman, 1961). Par contre, la formation de sel amorphe n'est pas inhibée. Remarquons dès à présent qu'*in vivo* le pourcentage de sel amorphe dans la fraction minérale de l'os est élevée mais variable avec l'âge : de 50 à 70 pour cent chez l'animal de 3 jours, le pourcentage de phosphate de calcium amorphe passe à 30 pour cent chez l'animal adulte (Termine et Posner, 1966) ; Eanes et coll., 1967).

Lorsque du pyrophosphate, à la concentration de 2 µM/l, est ajoutée à une suspension de cristaux d'hydroxyapatite, il se fixe rapidement et presque totalement sur les cristaux. Si on recommence plusieurs fois l'opération jusqu'à obtenir une concentration finale en pyrophosphate dans la solution voisine de 2 µM/l, on constate alors que le pyrophosphate fixé sur les cristaux représente 4,5 pour cent

de leur phosphore total (Fleisch et coll., 1966b et c). Dans l'os normal, le pyrophosphate représente à peu près 0,5 pour cent du phosphore total (Cartier, 1957 ; Perkins et Walker, 1958).

Les cristaux d'hydroxyapatite ainsi saturés en pyrophosphate, ne sont plus capables d'induire la précipitation de solutions sursaturées (Fleisch et coll., 1966c).

De plus, le pyrophosphate diminue la vitesse de dissolution des cristaux sur lesquels il a été fixé (Fleisch et coll., 1966b).

2.2. ACTION DES HOMOLOGUES DU PYROPHOSPHATE.

Le triphosphate (PPP) et EHDP ont des effets comparables à ceux de PP sur la formation, la croissance et la dissolution des cristaux d'hydroxyapatite (Francis, 1969 ; Francis et coll., 1969 ; Fleisch et coll., 1969a et 1970). De même que PP ils n'empêchent pas la formation de précipité amorphe.

Lors de la formation de cristaux d'hydroxyapatite, EHDP s'adsorbe fortement sur les microcristaux et empêche leur croissance ultérieure.

En résumé, le pyrophosphate et ses homologues constituent *in vitro* des "poisons" du cristal d'hydroxyapatite, quel que soit le stade de son existence. Il est donc légitime d'envisager que le pyrophosphate est, *in vivo*, un des facteurs permettant la sursaturation du plasma et des liquides extracellulaires.

3. Le processus de minéralisation dans l'os normal.

La figure 1 résume la théorie de Fleisch concernant la calcification et le remaniement osseux (Russel, Bisaz et Fleisch, 1969).

3.1. LA MINERALISATION.

Lors de la minéralisation (figure 1a), la précipitation du phosphate de calcium amorphe précède sa transformation en cristaux d'hydroxyapatite. Le pyrophosphate est sans effet sur la première étape, alors que la dernière étape est soumise à l'influence simultanée de substances nucléantes et d'inhibiteurs. L'action directe du pyrophosphate sur le collagène est encore discutée ; mais il a été montré que la fixation du pyrophosphate sur celui-ci est beaucoup plus importante que celle du sulfate, du fluor, du calcium, du strontium et du magnésium (Weinstock et coll., 1967).

La minéralisation commence par l'élimination de l'inhibiteur. Cette élimination pourrait se faire par l'intermédiaire de la phosphatase alcaline osseuse. Les phosphatases alcalines de nombreux tissus (Moss et coll., 1967), y compris l'os (Alcock et Shils, 1969), possèdent une activité pyrophosphatasique.

In vivo, il existe des preuves indirectes du rôle du pyrophosphate dans la calcification.

1 - Cartier et Picard (1955a,b,c) démontrent que la minéralisation de coupes de cartilage ossifiable de mouton est plus intense si l'ATP, et non le phosphate inorganique ou les esters phosphoriques, est la seule source de phosphore présente dans le milieu d'incubation.

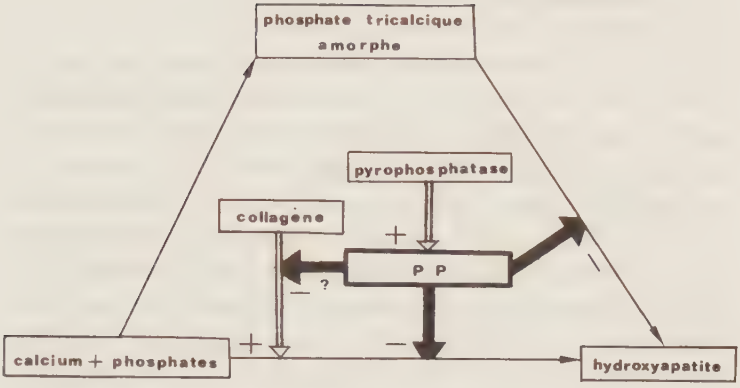
Au cours de la minéralisation, l'ATP est hydrolysé en AMP et PP. Le cristal formé diffère cependant notablement de l'hydroxyapatite et est principalement composé de pyrophosphate de calcium (80 pour cent). La faible activité pyrophosphatasique du cartilage ossifiable de mouton peut expliquer la nature du cristal formé (Cartier, 1957 ; Cerletti et coll., 1958).

2 - Perkins et Walker (1958), utilisant des coupes de cartilage hypertrophique de rat rachitique, mettent également en évidence un dépôt de pyrophosphate dans la substance minérale néoformée, lorsque le milieu d'incubation contient de l'ATP. Le cristal apparu ne contient que 5 pour cent de pyrophosphate, ce qui le rapproche du cristal osseux normal et est compatible avec une certaine activité pyrophosphatasique du tissu utilisé.

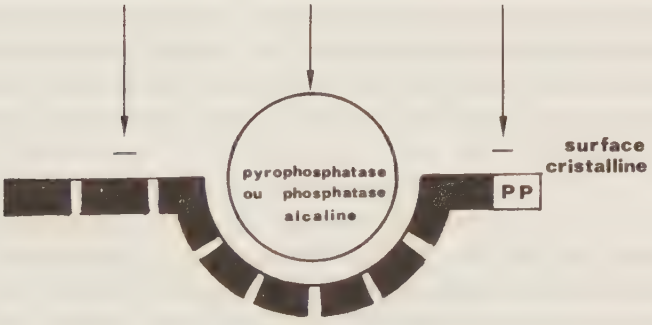
3 - Utilisant du cartilage costal de rat sain, Alcock et Shils (1969) démontrent qu'au cours de la croissance, l'élévation de l'activité pyrophosphatasique s'accompagne d'une captation accrue de ^{45}Ca par le cartilage, et que la minéralisation débute lorsque l'activité pyrophosphatasique est à son maximum. Cependant, ces auteurs ne trouvent pas de relation directe entre l'activité de la phosphatase alcaline et la calcification, suggérant ainsi l'existence de deux enzymes distinctes.

4 - Des doses élevées de pyrophosphate (20 fois la concentration plasmatique) empêchent la minéralisation de fémurs d'embryons de poulet en culture de tissu (Fleisch et coll., 1966a).

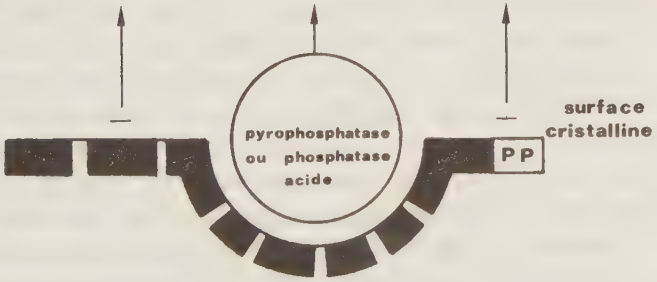
5 - L'hypophosphatasie s'accompagne de lésions osseuses ressemblant à celles du rachitisme. Biologiquement des concentrations élevées de pyrophosphate s'observent dans le sang et les urines (Russel, 1965). Ainsi, par défaut de destruction, du pyrophosphate s'accumule dans les liquides extracellulaires et empêche le dépôt normal de calcium.



1a. MINERALISATION



1b. ACCRETION OSSEUSE



1c. RESORPTION OSSEUSE

Figure 1 : **Rôle du pyrophosphate dans la calcification.**

3.2. LES REMANIEMENTS OSSEUX.

Lors des remaniements osseux, la substance minérale du tissu osseux normal est inactivée par le pyrophosphate qui tapisse sa surface. Pour que de nouveaux cristaux s'apposent il est nécessaire que localement une pyrophosphatase vienne détruire le pyrophosphate, mettant ainsi la surface minérale en contact avec un liquide extracellulaire sursaturé (Figure 1b). La phosphatase alcaline des ostéoblastes et des ostéocytes peut jouer ce rôle. De même, dans les cavités de résorption la dissolution ne peut se faire qu'après destruction du pyrophosphate par une pyrophosphatase (Figure 1c). Celle-ci pourrait être la phosphatase acide contenue en grande quantité dans les lysosomes cellulaires. Après hydrolyse du pyrophosphate, le cristal osseux entre en contact avec le liquide extracellulaire qui est, dans ce cas, non saturé provoquant la dissolution du cristal.

L'homéostasie du squelette se trouverait donc réglée par les fluctuations de la concentration locale en pyrophosphate. Les preuves directes de cette hypothèse manquent, car il n'est techniquement pas possible de mesurer les variations locales de concentration en pyrophosphate. Toutefois, des autohistoradiographies réalisées à l'aide de PYP-Sn-^{99m}Tc sur les têtes fémorales d'origine humaine (Tilden et coll., 1973), révèlent l'accumulation préférentielle des polyphosphates d'une part, dans le tissu sain, à la périphérie des zones les plus minéralisées et sur tout le tissu ostéoïde en voie de minéralisation, d'autre part, dans le tissu détruit, à la périphérie des cavités de résorption et au contact du tissu minéralisé. Chez le chat, des autoradiographies osseuses montrent que EHDP, marqué par ^{14}C, se concentre surtout à la périphérie de l'os

et, dans une certaine mesure, dans les trabécules (Jowsey et coll., 1970). Ces différents résultats indiquent clairement que les homologues du pyrophosphate se localisent, dans le tissu osseux, dans les régions de métabolismes calcique ou phosphaté accrus.

Les effets des dérivés phosphorés sur le remaniement osseux *in vivo* ont été étudiés surtout avec les diphosphonates car, résistants à l'hydrolyse enzymatique, leur action est plus importante que celle des polyphosphates. Le trouble observé concerne soit la minéralisation, soit la résorption osseuse, selon la dose administrée et les conditions expérimentales.

1 - Il est maintenant bien établi que EHDP donné à des doses élevées, à plusieurs espèces animales et à l'homme, provoque un accroissement du tissu ostéoïde (Fleisch et coll., 1971b, Jowsey et coll., 1970a ; King et coll., 1971 ; Russel et Smith, 1973 ; Cabanela et Jowsey, 1974). Bien que les facteurs de variabilité soient nombreux, des doses parentérales supérieures à 4 mg EHDP/kg/j pendant quelques jours sont nécessaires. L'aspect histologique observé au niveau des épiphyses est celui d'un rachitisme par carence en vitamine D (Russel et Smith, 1973). Les lésions sont réversibles après cessation de l'administration d'EHDP (King et coll., 1971). Il paraît acquis que l'aspect ostéoïde résulte d'une inhibition de la minéralisation ; dans les premiers jours, la synthèse de la matrice osseuse n'est pas perturbée mais, à plus long terme, un effet toxique direct sur l'ostéoblaste est possible (Cabanela et Jowsey, 1974).

2 - En culture de tissu, la résorption osseuse soit spontanée (Reynolds, 1970), soit stimulée par la parathomone (Fleisch et coll., 1969a ; Reynolds et coll., 1973) est ralentie par les diphosphonates. *In vivo*, l'effet hypercalcémiant de la parathormone est également réduit (Fleisch et coll.,

1969). Les diphosphonates s'opposent encore à l'ostéoporose consécutive à une immobilisation prolongée (Fleisch et coll., 1969b) mais n'influencent pas l'ostéoporose d'origine métabolique secondaire à la corticothérapie (Cabanela et Jowsey, 1971) ou à un régime pauvre en calcium et riche en phosphates (Jowsey et Holley, 1973).

Chez l'homme, les diphosphonates administrés *per os* n'ont pas d'effet thérapeutique dans l'ostéoporose primitive. Dans la maladie de Paget, ils réduisent l'activité métabolique osseuse et présentent donc un intérêt thérapeutique. Par contre, au cours du traitement de ces deux maladies, on observe l'apparition d'une ostéomalacie, néfaste pour le patient, qui limite l'intérêt de ces composés. Certains auteurs (King et coll., 1971 ; Russel et Smith, 1973) supposent qu'aux faibles doses de diphosphonate l'effet inhibiteur de la résorption osseuse prédomine, tandis qu'aux doses élevées le trouble de la minéralisation l'emporte. La dose thérapeutique idéale serait donc difficile à trouver et des facteurs de variations individuelles, surtout en administration *per os*, expliqueraient les médiocres résultats obtenus. Par contre, Cabanela et Jowsey (1974), constatant l'absence de modifications de la résorption osseuse après l'administration prolongée d'EHDP, mettent en doute l'effet protecteur *in vivo* d'EHDP,contre la résorption osseuse.

III. LE PYROPHOSPHATE ET LA REGULATION PHOSPHO-CALCIQUE DES ESPACES EXTRACELLULAIRES.

Se comportant *in vitro* et *in vivo* en "poison" des cristaux d'hydroxyapatite, le pyrophosphate apparaît comme un régulateur important dans l'homéostasie calcique.

1. Effets du pyrophosphate sur la composition ionique du milieu extracellulaire.

Les concentrations élevées en calcium, phosphate et phosphate tricalcique amorphe que l'on rencontre dans le milieu extracellulaire osseux sont une des conséquences de la présence locale de pyrophosphate. Le liquide baignant l'apatite est sursaturé et le phosphate de calcium amorphe est métastable par rapport à l'apatite. Ce milieu amorphe, plus facilement mobilisable et échangeable que les dépôts cristallins, joue un rôle essentiel dans la régulation du calcium.

2. Pyrophosphate et activité pyrophosphatasique.

Le pyrophosphate est produit par la cellule à partir de l'ATP au cours des réactions de synthèse de nombreux composés, parmi lesquels les protéines, les acides nucléiques et les lipides. La quantité produite est considérable puisqu'on l'estime, par exemple, dans le foie à environ 30 g par 24 heures, uniquement lors des réactions de synthèse de l'albumine (Kaplan, 1972). Malgré cela, l'excrétion urinaire du pyrophosphate est réduite et l'accumulation dans les liquides extracellulaires très faible. La majeure partie du pyrophosphate formé est dégradée localement par des pyrophosphatases.

L'hydrolyse enzymatique de PP est importante car :

1 - Elle maintient les réactions de l'anabolisme cellulaire à un niveau convenable, empêchant un des produits de la réaction de s'accumuler.

2 - Elle libère des ions orthophosphates qui retournent dans le pool des phosphates.

3 - Elle subit l'influence des concentrations locales de nombreux ions, liant ainsi

métabolisme cellulaire et composition ionique du liquide extracellulaire.

4 - Elle serait également sensible à l'action de la parathomone et de la calcitonine, mais les preuves en faveur de cette dernière hypothèse manquent.

Ainsi la cellule peut contrôler directement le processus de minéralisation par l'intermédiaire de la pyrophosphatase dont la synthèse est sous sa dépendance. Les concentrations ioniques locales exercent une action régulatrice en agissant directement sur l'activité pyrophosphatasique.

Nous allons rappeler brièvement les données de la littérature concernant l'activité pyrophosphatasique et ses régulations.

2.1. PYROPHOSPHATASE ET PHOSPHATASES.

Il est bien établi que la phosphatase alcaline possède une activité pyrophosphatasique ; néanmoins l'existence d'une pyrophosphatase distincte de la phosphatase n'est pas à exclure.

Une activité pyrophosphatasique est présente dans de nombreux organes parmi lesquels l'os (Alcock et Shils, 1969), le foie, le rein, l'intestin grêle, le coeur (Soodsman et Nordlie, 1966) et le cerveau (Cohen, 1970). Son activité maximum se situe au voisinage de la neutralité. L'apparition de cette activité nécessite la présence d'ions Mg^{2+} (Moe et Butler, 1972a ; Unemoto et coll., 1973). Par contre l'ion Ca^{2+} est fortement inhibiteur (Moe et Butler, 1972b). L'activité pyrophosphatasique disparaît également en présence d'autres cations divalents : Fe^{2+}, Mn^{2+}, Ba^{2+}, Hg^{2+}. Remarquons que l'os humain contient 50 à 70 pour cent de la totalité du magnésium de l'organisme, soit 1000 à 1400 mEq

sur un total de 2000 mEq. Le rapport entre le magnésium et le calcium du squelette est très faible, 1 pour 50 (Fourman et Royer, 1970). Toutefois, le rôle physiologique du magnésium dans la minéralisation est certain. Celui-ci apparaît comme un régulateur du processus.

Les phosphatases alcalines sont dépourvues de spécificité de substrat et s'avèrent capables d'hydrolyser des composés variés renfermant des liaisons de type "P-O-C", "P-O-P", "P-S-C", "P-F", "P-N", à l'exclusion de la liaison phosphonate "P-C" (Brunel, 1972). Les phosphatases alcalines peuvent donc hydrolyser les pyrophosphates (Heppel et coll., 1962 ; Eaton et Moss, 1967 ; Moss et coll., 1967 ; Fernley et Walker, 1967 ; Wöltgens et coll., 1971). Les activités phosphoestérasiques et pyrophosphatasiques sont la propriété d'une seule enzyme possédant un seul site actif (Fernley et Bisaz, 1968). En la présence simultanée d'esters et de pyrophosphate, l'hydrolyse des deux substrats a lieu, mais chacun est inhibiteur compétitif de l'hydrolyse de l'autre; néanmoins les pH d'action optimum sont distincts (respectivement 9 et 8 pour les activités phosphoestérasiques et pyrophosphatasiques).

L'activité pyrophosphatasique de la phosphatase alcaline est augmentée par de faibles concentrations de Mg^{2+}, mais inhibée par Zn^{2+} (Moss, 1969), et l'ion orthophosphate (Fernley et Walker, 1967). L'activité estérasique est augmentée par Mg^{2+}, et inhibée par les ions orthophosphate, arséniate, Zn^{2+} et Be^{2+}. L'ion F^- est sans effet sur cette activité (Cohen, 1970). *In vivo*, l'effet du béryllium sur la phosphatase alcaline se manifeste par l'apparition de lésions osseuses ressemblant à celles du rachitisme (Klemperer, 1949).

Les études de préparations purifiées de phosphatase alcaline d'origine rénale ont montré

qu'il s'agissait d'une métalloenzyme, le zinc entrant dans sa constitution.

Les phosphatases acides sont également capables d'hydrolyser une grande variété de substrats, dont le pyrophosphate. Néanmoins, il ne s'agit pas de métalloenzymes et leur susceptibilité à l'égard des ions est moins clairement définie que pour la phosphatase alcaline (Cohen, 1970).

2.2. MECANISMES DE REGULATION DE L'ACTIVITE PYROPHOSPHATASIQUE PAR LES CATIONS DIVALENTS.

Les effets des différents cations divalents sur la pyrophosphatase et la phosphatase alcaline posent les problèmes des relations pouvant exister entre cations, enzyme et pyrophosphate.

- l'enzyme doit-elle être activée au préalable par Mg^{2+} ?
- le véritable substrat est-il $(PP)^{4-}$, ou bien le complexe $Mg(PP)^{2-}$?
- l'inhibition par Ca^{2+} résulte-t-elle d'une compétition avec Mg^{2+} pour le site actif, ou bien de la formation d'un chélate $Ca(PP)^{2-}$ résistant à l'action de l'enzyme ?

Beaucoup de ces questions ne sont encore qu'imparfaitement résolues. Il paraît actuellement prouvé que l'ion chélaté par le pyrophosphate a une grande influence sur la vitesse d'hydrolyse de PP (Brunel, 1972 ; Ridlington et Butler, 1972 ; Moe et Butler, 1972a et b). Ces résultats sont intéressants à confronter à ceux obtenus avec le complexe de pyrophosphate stannotechnétié. La stabilité *in vivo* de ce composé, supérieure à celle de son homologue non complexé, serait comparable à celle des chélates de calcium en présence de pyrophospha-

tase. Rappelons que dans le complexe stannotechnétié l'étain est, lui aussi, à l'état d'oxydation +2, et que le technétium est à l'état +4. Bowen et Garnett (1974) proposent pour ce complexe une structure cyclique dans laquelle l'ion complexé est le groupement $(TcO)^{2+}$. Dans un tel cycle, l'étain n'intervient pas mais il se forme un chélate avec deux valences du technétium. Le complexe réalisé demeure ionisé avec deux fonctions acides, ce qui lui permet de conserver son pouvoir d'adsorption sur les microcristaux d'hydroxyapatite.

IV. ROLE PROTECTEUR DU PYROPHOSPHATE ET DE SES HOMOLOGUES DANS LA MINERALISATION DES TISSUS MOUS.

Les substances nucléantes sont largement distribuées dans tout l'organisme, et une minéralisation peut se produire dans de nombreux tissus mous (Thomas et Tomita, 1967) ; l'existence d'inhibiteurs de la calcification est donc envisagée. L'ion pyrophosphate pourrait en faire partie.

C'est ainsi que l'administration de pyrophosphate (Fleisch et coll., 1965) ou de diphosphonate (Francis et coll., 1969b ; Fleisch et coll., 1970a) empêche la calcification de l'aorte de rats recevant de fortes doses de vitamine D3 ; parallèlement, on n'observe pas d'altérations de la calcification osseuse (Irving et coll., 1966). Les pyrophosphates bloquent également la minéralisation de la peau (calciphylaxie) provoquée par divers procédés (Schibler et Fleisch, 1966 ; Gabbiani, 1966 ; Gabbiani et coll., 1966). Contrairement aux polyphosphates, les diphosphonates sont actifs contre les calcifications rénales (Fleisch et coll., 1970b).

Chez l'homme, les faibles concentrations de pyrophosphate urinaire (Fleisch et Bisaz, 1962a) suffisent à expliquer pourquoi les urines se maintiennent sursaturées en calcium et phosphates. En thérapeutique, les diphosphonates ont été utilisés avec un succès certain dans la myosite ossifiante généralisée (Bassett et coll., 1969 ; Cram et coll., 1971 ; Russell et Smith, 1973). Leur action porte surtout sur la minéralisation de la matrice ectopique, mais la formation de cette dernière n'est pas inhibée.

Comme pour le tissu osseux, la concentration en pyrophosphates du tissu mou dépend de l'activité pyrophosphatasique. Pour que le pyrophosphate soit présent à dose protectrice, il est logique de supposer que l'activité pyrophosphatasique locale est faible. De fait, Cartier et Picard (1955d) ont montré que le cartilage est dépourvu d'activité pyrophosphatasique alors que l'os hydrolyse rapidement les pyrophosphates. De même, Solomon et coll., (1966) observent que l'injection sous cutanée de phosphatase alcaline d'Escherichia Coli à des rats présensibilisés par la vitamine D3 provoque des calcifications cutanées (calciphylaxie), alors que la simple injection de l'enzyme inactivée par la chaleur ne provoque pas de calcification.

L'injection d'orthophosphate diminue l'activité pyrophosphatasique rénale. Ainsi, chez l'homme, observe-t-on une augmentation de la clearance rénale du pyrophosphate, sans modification de sa concentration plasmatique (Fleisch et Bisaz, 1964). De même, chez le chien, l'injection dans l'artère rénale d'orthophosphate s'accompagne d'une élévation de l'excrétion urinaire du pyrophosphate (Fleisch et Russel, 1970). Seule une diminution de la destruction du pyrophosphate par les reins

permet d'expliquer ces résultats. C'est peut-être là, également, l'explication des succès thérapeutiques obtenus dans certaines urolithiases avec les phosphates.

A côté des variations du contenu extracellulaire en pyrophosphate et en activité pyrophosphatasique, on peut aussi observer, lors de la minéralisation des tissus mous, des modifications histologiques des cellules résultant de graves perturbations métaboliques. L'étude des désordres cellulaires accompagnant l'anaerobiose sera faite dans le chapitre suivant.

V. CONCLUSIONS.

Ainsi, le rôle physiologique du pyrophosphate pourrait être celui d'une substance capable d'inhiber la calcification, et de stabiliser les cristaux d'hydroxyapatite dans un environnement sursaturé en calcium et phosphates. Produit par le métabolisme cellulaire, le pyrophosphate exercerait son action dans le milieu extracellulaire, mais resterait sous l'influence de la cellule par l'intermédiaire de la pyrophosphatase. L'activité de cette enzyme reflèterait non seulement l'anabolisme cellulaire responsable de la synthèse de l'enzyme, mais aussi la composition ionique du milieu ambiant, car l'enzyme est activée ou inhibée par de nombreux ions.

Lors des explorations du squelette par les complexes stannotechnétiés du pyrophosphate et de ses homologues, les zones les plus actives sont celles d'intenses minéralisation ou remaniement osseux. Dans ces territoires, le métabolisme osseux étant accru, le pyrophosphate, après avoir gagné les espaces extracellulaires, devrait être attaqué par

la pyrophosphatase locale. La forme complexée ne pouvant être hydrolysée, PP-Sn-Tc diffuserait alors vers les surfaces cristallines. Finalement, la grande affinité du pyrophosphate marqué pour les cristaux d'hydroxyapatite provoquerait l'apparition de foyers radioactifs là où existe une augmentation de la surface cristalline accessible à partir du courant sanguin. La similitude des résultats obtenus avec les complexes stannotechnétiés de pyrophosphate et de diphosphonates (Serafini et coll., 1974) serait la conséquence des similitudes de leur comportement à l'égard de la pyrophosphatase et des cristaux d'hydroxyapatite.

CHAPITRE TROISIEME

I - LES MOUVEMENTS IONIQUES CELLULAIRES

1. Calcium et perméabilité de la membrane axonale
2. Mitochondrie et transports ioniques
2.1 - Caractères généraux
2.2 - Les transports ioniques mitochondriaux dans la minéralisation osseuse
2.3 - Rôle de la mitochondrie dans le myocarde sain

II - CONSEQUENCES METABOLIQUES ET ULTRASTRUCTURALES DE L'ISCHEMIE CEREBRALE ET MYOCARDIQUE

1. Ischémie et anoxie
2. Modifications métaboliques
2.1 - En aérobiose
2.2 - En anaérobiose
3. Modifications morphologiques
3.1 - Dans le tissu nerveux
3.2 - Dans le myocarde

III - CONCLUSIONS

CHAPITRE TROISIEME

FONCTIONS CELLULAIRES ET METABOLISME PHOSPHOCALCIQUE DANS LE TISSU SAIN ET LORS D'HYPOXIES OU D'ISCHEMIES TISSULAIRES

Dans le chapître précédent, nous avons montré le rôle régulateur du pyrophosphate dans les processus de calcification. Cet aspect du métabolisme phosphocalcique concerne essentiellement les liquides extracellulaires et leurs caractéristiques physico-chimiques. Nous nous proposons d'étudier maintenant les relations existant entre la composition de la phase minérale et le métabolisme cellulaire. En effet, le pool minéral intracellulaire est certes influencé par les concentrations de calcium et de phosphates baignant la cellule, mais le métabolisme phosphocalcique cellulaire est également un élément essentiel dans la régulation de ce pool. En conséquence, il est nécessaire de considérer le phénomène au niveau extracellulaire, et aussi au niveau intracellulaire.

En fait, la régulation de certains échanges ioniques entre les liquides extracellulaires et le milieu intracellulaire constitue une fonction capitale pour les cellules osseuses. Une fonction similaire est remplie par les neurones et les cellules myocardiques. Bien qu'impliqués différemment au niveau de l'os, du tissu nerveux et du myocarde, le

calcium et les phosphates se trouvent concernés par ces échanges ioniques. Les phénomènes de perméabilité membranaire participent au processus régulateur des échanges, mais les besoins métaboliques lors de l'établissement de certains gradients ioniques jouent le rôle le plus important, ces mécanismes représentant pour la cellule une consommation d'énergie.

Lors d'hypoxies tissulaires, des troubles de la perméabilité membranaire accompagnent une diminution de la production des composés riches en énergie. La régulation des échanges ioniques se trouve atteinte ; et, en fin de compte, l'arrêt des fonctions cellulaires spécialisées traduit les perturbations ioniques intracellulaires consécutives au passage en anaérobiose.

Avant d'envisager les conséquences métaboliques et ultrastructurales de l'ischémie cérébrale ou myocardique, il nous faut donc examiner certains aspects des mouvements ioniques cellulaires :

- D'une part, la perméabilité membranaire aux ions a été surtout étudiée au niveau des axones et le calcium paraît y jouer un rôle régulateur.

- D'autre part, les mitochondries sont le siège non seulement de la phosphorylation oxydative, mécanisme producteur de composés riches en énergie, mais aussi de transports ioniques. Ce dernier processus est intimement lié au métabolisme mitochondrial, et l'énergie provenant de la respiration peut, dans certaines conditions, s'orienter vers le "pompage" d'ions, parmi lesquels le calcium et les phosphates sont les plus importants.

I. LES MOUVEMENTS IONIQUES CELLULAIRES.

1. Calcium et perméabilité de la membrane axonale.

La propagation d'un potentiel d'action constitue l'essentiel du rôle fonctionnel des cellules nerveuses. Dans la théorie ionique de Hodgkin et Huxley, une dépolarisation s'accompagne d'une augmentation très rapide de la perméabilité membranaire au sodium et au potassium. Les "pompes" couplées à Na^+ et à K^+ se trouvent alors débordées par d'intenses mouvements d'ions, qui diffusent au travers des pores de la membrane axoplasmique.

Dans l'axoplasme, le calcium libre ne représente qu'une faible proportion du calcium total (2,5 p.cent environ). Une partie du calcium lié se trouve dans la membrane et la baisse de la teneur en calcium accroît sa perméabilité au sodium et au potassium. Il a donc eté suggéré que les ions calciques peuvent oblitérer au repos les pores de la membrane axoplasmique.

Le tissu nerveux renferme de très nombreuses structures membranaires riches en lipoprotéines. Les études isotopiques à l'aide de phosphates marqués par ^{32}P ont montré que le renouvellement des phosphates entrant dans la composition des phospholipides cérébraux était importante et rapide, surtout pour ce qui concerne les phosphoinositides (Chiewitz et Hevesy, 1935, Yamamoto, 1959 ; Hawthome et Kai, 1970). Ainsi, le métabolisme des di- et triphosphoinositides pourrait être relié au contenu en calcium et à la perméabilité de la membrane axonale (Hawthorne et Kai, 1970). Cette hypothèse (Figure 2) suppose l'existence de régions membranaires riches en polyphosphoinositides au niveau desquelles une phosphoestérase peut libérer un phosphate et le calcium associé. Cette phosphoestérase,

mise en action lors de la dépolarisation, rendrait la membrane axonale perméable aux ions Na^+ et K^+. A la fin de la dépolarisation, l'ion sodium présent en grande quantité inhiberait l'activité esterasique alors que des kinases, actives seulement aux faibles concentrations calciques, entreraient en jeu pour synthétiser à nouveau les polyphosphoinositides.

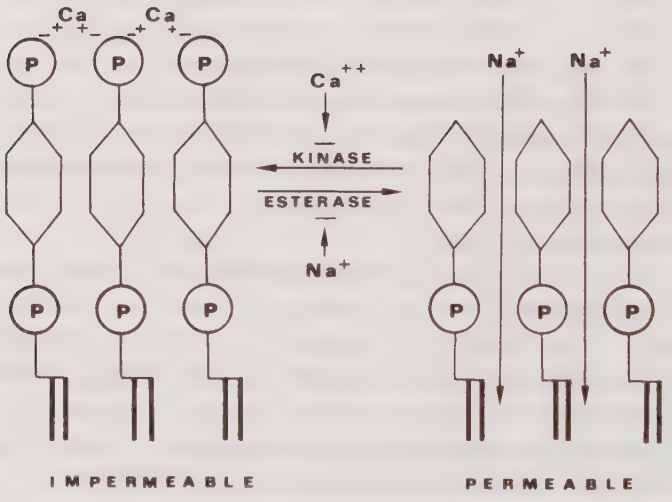


Figure 2: Rôle possible du calcium et des polyphosphoinositides dans la perméabilité membranaire.

2. Mitochondrie et transports ioniques.

2.1. CARACTERES GENERAUX.

Les mitochondries isolées à partir de reins de rats sont capables d'accumuler du calcium ionisé en grande quantité, plusieurs centaines de fois leur contenu initial en Ca^{2+} (Vasington et Murphy, 1962). Le processus bloque la phosphorylation oxydative auquel il se substitue. En effet, en présence d'un mélange équimolaire de Ca^{2+} et d'ADP, les mitochondries hépatiques captent Ca^{2+} aux dépens de la phosphorylation d'ADP. Tant que Ca^{2+} est présent en concentration suffisante dans le milieu, il ne se forme pas d'ATP (Lehninger, 1970).

En l'absence d'autres ions diffusibles, et en particulier d'anions, l'entrée de Ca^{2+} dans les mitochondries hépatiques s'accompagne d'un départ d'ions H^+. Le calcium se fixe sur la membrane interne, et les mitochondries restent de taille normale. Ce processus est très rapide ; il dépend complètement des transferts d'électrons, mais se trouve capable d'accumuler de grandes quantités de calcium et est dit, de ce fait, "superstoechiometrique" (Lehninger, 1970).

En présence d'anions, c'est le phosphate qui pénètre préférentiellement aux autres anions avec le calcium. Une première phase, rapide et superstoechiométrique, consiste en une fixation membranaire du calcium. Secondairement, le calcium, accompagné du phosphate, diffuse dans la matrice mitochondriale (Lehninger, 1974 ; Schuster et Olson, 1974a). Cette phase est beaucoup plus lente que la précédente et provoque, elle aussi, une stimulation des transferts d'électrons ; 2 ions Ca^{2+} ou bien une mole d'ADP stimulent la respiration de façon comparable (Lehninger, 1974). Le rapport entre ions

concentrés et transferts d'électrons est donc devenu stoechiométrique. *In vitro*, l'alternance de cycles respiratoires stimulés par le calcium, ou par l'ADP, peut se produire sans affecter l'efficacité des transferts d'électrons. Le calcium ainsi accumulé reste en solution dans la matrice mitochondriale et les mitochondries apparaissent alors gonflées (Lehninger, 1970).

L'addition au milieu d'incubation d'ATP, de Mg^{2+} et d'un substrat du métabolisme oxydatif (succinate par exemple) favorise grandement l'entrée du calcium et des phosphates dans la mitochondrie. Dans ce dernier cas, le rapport molaire entre le calcium et les phosphates concentrés dans la mitochondrie est de 1,67. Ces dernières ne sont que discrètement gonflées mais contiennent alors des granules de grande taille, très denses aux électrons (Greenawalt et coll., 1964). Ces granules denses sont formés de phosphate tricalcique amorphe.

En réalité, les mouvements ioniques sont bidirectionnels et, lorsque des mitochondries sont dans un premier temps chargées en calcium puis placées dans un milieu pauvre en calcium, elles le libèrent rapidement (Greenawalt et coll., 1964). Ce processus est activé par les inhibiteurs de la respiration, l'anaérobiose (Azzi et Chance, 1969), et l'AMP cyclique (Lehninger, 1974).

Les mitochondries hépatiques sont capables d'accumuler de nombreux ions, mais le couplage du transport ionique avec les processus respiratoires mitochondriaux n'existe que pour Ca^{2+}, Sr^{2+} et Mn^{2+}. De plus, c'est pour Ca^{2+} que la captation est la plus rapide (Lehninger, 1970). Les mitochondries de tous les tissus examinés de mammifères, donc de cerveau et de coeur, ont cette propriété (Moore et Strasberg, 1970 ; Brierley et coll., 1964).

Pour se concentrer à l'intérieur de la mitochondrie, le calcium doit traverser une membrane, ce qui suppose l'existence d'un transporteur. Deux modes de transport ont été proposés (Pullman et Schatz, 1967 ; Lehninger, 1970 et 1974).

L'un est unidirectionnel et dépend de la formation d'un composé intermédiaire hydrogéné, riche en énergie, au cours des transferts d'électrons.

L'autre suppose l'existence d'un vecteur passif, fonctionnant de façon bidirectionnelle selon un potentiel de membrane. Ce dernier modèle est le plus vraisemblable et nous l'adopterons. Dans celui-ci, le rôle des transferts d'électrons est de "pomper" les H^+ de la matrice mitochondriale vers l'extérieur. Les anions phosphates peuvent ainsi diffuser vers la matrice mitochondriale et il se crée un potentiel de membrane dont le pôle négatif est à l'intérieur de la mitochondrie. Ce potentiel sert alors à concentrer le calcium, par l'intermédiaire de son transporteur, dans la matrice mitochondriale. Le processus de concentration utilise donc le même ensemble fonctionnel que la phosphorylation oxydative et, selon le sens du gradient ionique, on observera soit l'accumulation de Ca^+ soit la phosphorylation d'ADP.

En résumé, l'énergie produite lors des transferts d'électrons se conserve soit sous forme d'ATP, soit sous forme de gradients ioniques (figure 3). Deux points importants sont à remarquer :

1 - Tant que des niveaux suffisants de calcium et d'énergie sont présents, la mitochondrie accumule préférentiellement du calcium. Cette prévalence des transports ioniques sur la phosphorylation oxydative est une propriété commune aux mitochondries de tous les organes de vertébrés examinés à ce jour. Un tel processus doit donc avoir une signification

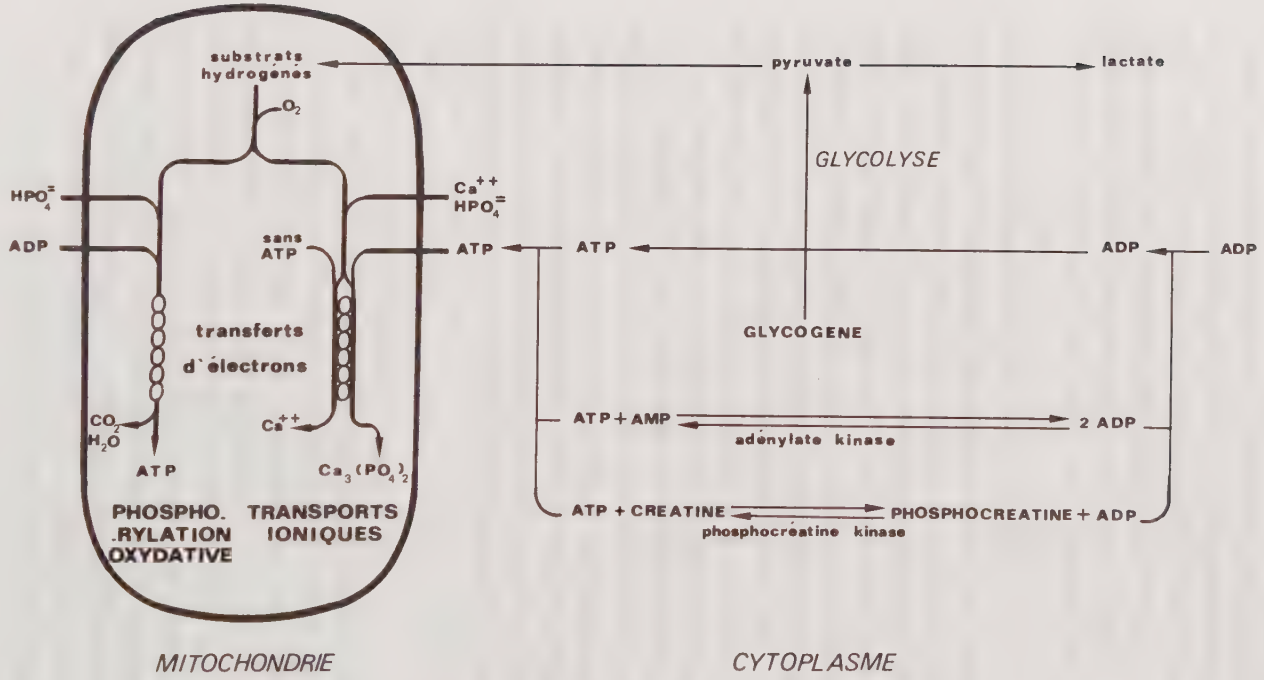


Figure 3 : **Utilisations par la mitochondrie de l'énergie des métabolites cellulaires.**

physiologique réelle.

2 - Sur le plan biochimique, l'accumulation de calcium s'accompagne d'une acidification du cytoplasme et, lorsqu'il est disponible, d'une dégradation de l'ATP. Ce dernier est produit par diverses voies métaboliques : les unes sont rapides (transphosphorylation de l'ADP et de la phosphocréatine) alors que les autres sont plus lentes et consomment du glycogène. Ainsi, la glycolyse anaérobie semble propice aux transports ioniques mitochondriaux car elle produit du lactate susceptible de tamponner les ions H^+ et un peu d'ATP. Nous allons, dans ce qui suit, apporter quelques preuves à l'appui de cette hypothèse en étudiant d'une part le métabolisme osseux normal et, d'autre part, le métabolisme des tissus cérébraux et myocardiques ischémiés.

2.2. LES TRANSPORTS IONIQUES MITOCHONDRIAUX DANS LA MINERALISATION OSSEUSE.

Les premières recherches sur les chondrocytes et les ostéoblastes ont eu pour but d'établir la fonction de ces cellules pour ce qui concerne la synthèse du collagène et des mucoprotéines (Prockop, 1969). Cependant, plus récemment, l'attention a été portée sur le rôle de ces mêmes cellules dans les échanges ioniques (Taves, 1965), et il est maintenant certain que les chondrocytes et les ostéoblastes interviennent directement dans les toutes premières étapes du processus de calcification.

La concentration intracellulaire du calcium est beaucoup plus élevée dans les cellules osseuses (200 millimoles/kg) que dans les cellules des autres organes (2 à 3 millimoles/kg) (Nichols et coll., 1969). Mais la répartition au sein de la cellule est inhomogène et, après fragmentation des cellules, la plus grande partie (plus de 75 p.cent) du

calcium se trouve associée aux organites intracellulaires de sorte que sa concentration intracytoplasmique est mille fois plus faible que celle du compartiment plasmatique (Porle, 1970). Au moyen de techniques de microincinération en microscopie électronique, Martin et Matthews (1970) établissent que les mitochondries des chondrocytes, des ostéoblastes et des ostéocytes contiennent des granules denses formés d'une substance minérale. Ultérieurement, la diffraction des rayons X a montré que certains de ces granules intramitochondriaux contiennent du calcium et du phosphore (Sutfin et coll., 1971).

Ces données suggèrent donc que les chondrocytes et les ostéoblastes ont un rôle de "pompe" à l'égard des ions minéraux qui seraient prélevés du milieu sanguin, concentrés par les mitochondries pour être enfin cédés à la matrice extracellulaire et donner lieu ainsi à la calcification (Ascenzi et Bonucci, 1970) (Figure 4).

Cette hypothèse présente l'intérêt d'expliquer en partie le rôle activateur joué par l'ATP dans les processus de calcification (Cartier et Picard, 1955 ; Perkins et Walker, 1958) (cf. chapitre II, II - 3.1), puisque l'ATP stimule aussi bien la minéralisation que la formation de granules denses dans les mitochondries. Ces derniers sont formés de phosphate tricalcique amorphe ; la présence locale d'un inhibiteur empêche donc leur transformation en cristaux d'hydroxyapatite plus stables. La dégradation de l'ATP en AMP et PP favoriserait l'apparition au sein de la mitochondrie d'un tel inhibiteur. Néanmoins, les preuves directes en faveur des réactions impliquées manquent (Léonard et Scullin, 1969 ; Léonard et coll., 1971).

Les granules denses intramitochondriaux jouent ainsi un rôle de réserve en calcium et phosphates. Un problème non encore résolu est de savoir comment les ions passent des mitochondries dans les espaces extracellulaires. Lehninger (1970) suppose

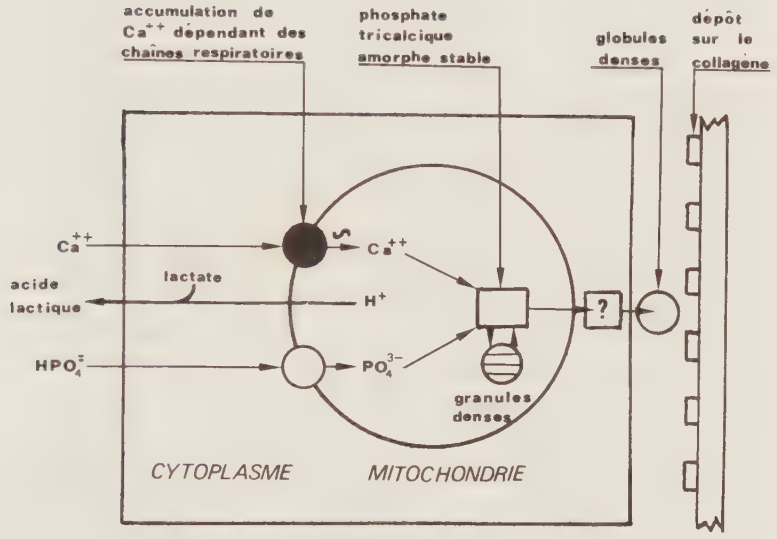


Figure 4 : Rôle possible de la mitochondrie dans la minéralisation osseuse.

la formation de particules colloïdes capables de franchir la membrane mitochondriale soit directement, soit par un processus inverse de celui de la phagocytose. Ultérieurement, il est possible en microscopie électronique de mettre en évidence dans la bordure ostéoïde entourant les ostéoblastes des globules d'origine cellulaire. Ces globules, limités par une membrane dense, renferment une matrice organique et une phase minérale parfois amorphe, parfois cristalline, et diffractant, dans ce dernier cas, les rayons X comme l'hydroxyapatite. L'apparition de cristaux se fait d'abord indépendamment des structures fibrillaires au sein d'une abondante substance fondamentale, puis en contact étroit avec les fibres collagènes (Bonucci, 1971).

Une preuve directe du rôle des mitochondries dans la calcification a été apportée récemment par Brighton et Hunt (1974). Dans le cartilage de conjugaison, l'examen en microscopie électronique des différentes couches cellulaires révèle, en premier lieu, une accumulation du calcium dans les mitochondries des chondrocytes hypertrophiés. Puis, lorsqu'on progresse vers le cartilage calcifié, on s'aperçoit que le calcium extracellulaire augmente aux dépens du calcium intramitochondrial qui diminue. Il est intéressant de relier ces modifications du calcium intramitochondrial aux modifications du métabolisme cellulaire, lesquelles traduisent la maturation du chondrocyte depuis le cartilage hyalin indifférencié jusqu'au cartilage calcifié.

Les études biochimiques faites sur le tissu osseux révèlent que l'os diffère de la plupart des autres tissus en ce qu'il fait largement appel à la glycolyse pour sa production d'énergie. La plus grande partie du glucose absorbé par l'os est transformé en acide lactique ; une certaine quantité est oxydée par la voie des pentoses, mais seules des traces participent au cycle de Krebs, même lorsque les conditions d'incubation sont aérobiques (Flanagan et Nichols, 1965). La production d'acide lactique entraîne la formation d'un gradient d'acidité autour de la cellule et empêche ainsi le calcium et les phosphates de précipiter dans le voisinage immédiat de la cellule.

Au milieu du cartilage de conjugaison, les études locales de la pression en oxygène (Brighton et Hunt, 1974) montrent une pression élevée dans le cartilage sérié qui va diminuant dans le cartilage hypertrophique. Parallèlement, le glycogène s'accumule dans le cartilage sérié et la première moitié du cartilage hypertrophique, alors qu'il disparaît dans la seconde moitié. Ainsi, au niveau du cartilage sérié, la pression partielle en oxygène

est élevée et le métabolisme, aérobique, est orienté vers la glycogénogénèse. Au contraire, dans le cartilage hypertrophique, la pression partielle en oxygène est faible et la cellule consomme son glycogène et produit du lactate. Dans la première moitié du cartilage hypertrophique, les mitochondries accumulent du calcium et des phosphates et libèrent des protons dans le cytoplasme cellulaire. Dans la seconde moitié du cartilage hypertrophique, l'oxygène et le glycogène ne sont plus disponibles. Aucune source d'énergie ne peut plus entretenir les transferts d'électrons dans la mitochondrie et celle-ci cède progressivement son calcium aux espaces extracellulaires.

Il apparaît finalement que la régulation du métabolisme phosphocalcique au niveau de l'os est sous la dépendance de la teneur en oxygène du milieu. Au niveau de la cellule, le passage en hypoxie s'accompagne dans un premier temps de l'accumulation de phosphate de calcium sous forme de granules denses intramitochondriaux, puis, secondairement, d'un épuisement de ces granules et de la mort cellulaire.

2.3. ROLE DE LA MITOCHONDRIE DANS LE MYOCARDE SAIN.

La contraction musculaire résulte d'une réaction intracytoplasmique entre l'actomyosine et l'ATP. Cette réaction est activée par les ions Ca^{2+}. Il existe donc une "pompe à calcium" qui aspire celui-ci en dehors du cytoplasme en fin de contraction musculaire, et maintient ainsi la concentration calcique du cytoplasme à un niveau inférieur à 10^{-7} mole/litre (Wood et coll., 1969 ; Klaus, 1972 ; Lehninger, 1974). Plusieurs mécanismes concourent à la régulation des mouvements du calcium cellulaire (Figure 5).

1 - Déja cités (cf. I - 1), les échanges ioniques transmembranaires dépendent de transporteurs dont l'activité est régulée par les ions Na^+ et Ca^{2+}.

2 - Le calcium intracytoplasmique (Ca_I^{++}) est capable de s'échanger rapidement avec celui séquestré par des organites cytoplasmiques (Ca_M), dont les deux plus importants sont le reticulum sarcoplasmique et les mitochondries. Le reticulum forme un réseau de tubules en étroit contact avec les myofibrilles et joue un rôle dans la distribution du calcium et de l'ATP nécessaires à la contraction. Il est capable de concentrer le calcium dans ses tubules en présence d'ATP fourni localement par la glycolyse (Katz et Repke, 1967). Cependant, les muscles rouges et le myocarde s'opposent aux muscles blancs par la relative pauvreté de leurs cellules en réticulum sarcoplasmique et une plus grande richesse en mitochondries. Ces dernières représentent en volume le tiers des cellules myocardiques et il est donc logique de penser que les transports ioniques mitochondriaux participent à la contraction myocardique (Klaus, 1972 ; Lehninger, 1970 et 1974). Pour pouvoir jouer un rôle dans un tel processus, le calcium mitochondrial doit être facilement mobilisable et, de ce fait, les échanges doivent se faire avec le calcium fixé sur les membranes mitochondriales (Lehninger, 1974). La mise en réserve de cet ion sous une forme non directement mobilisable (Ca_R) permet au pool calcique cellulaire de s'adapter à l'activité de la cellule. On sait en effet qu'en période d'activité exagérée la fraction mobile du calcium cellulaire est de 80 p.cent, alors qu'elle n'est que de 60 p.cent en période de repos (Klaus, 1972). Le calcium contenu dans la matrice mitochondriale pourrait représenter cette forme de réserve.

3 - Dans le cytoplasme des cellules musculaires il existe une protéine soluble capable de fixer le calcium (Fourman et Poyer, 1970).

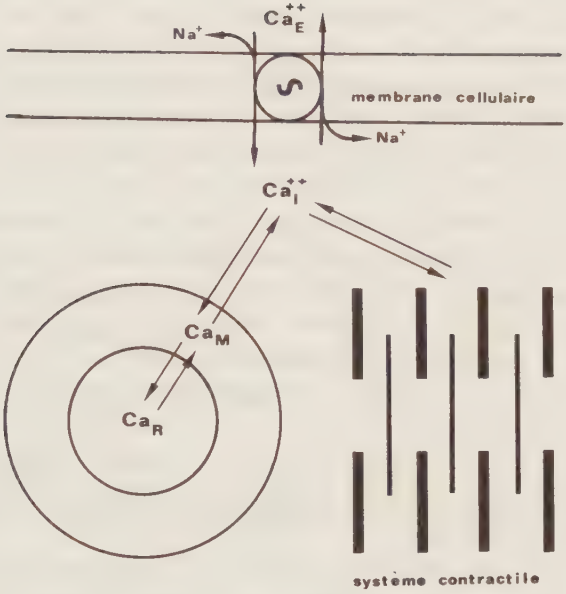


Figure 5 : Les différents compartiments du calcium cellulaire myocardique.

II. CONSEQUENCES METABOLIQUES ET ULTRASTRUCTURALES DE L'ISCHEMIE CEREBRALE ET MYOCARDIQUE.

1. Ischémie et anoxie.

Dans les conditions physiologiques, le système nerveux et le myocarde obtiennent de la phosphorylation oxydative l'essentiel de l'énergie dont ils ont besoin.

L'occlusion subite d'une artère (Figure 6) provoque une baisse du débit sanguin dans le

territoire irrigué par ce vaisseau ; lorsque la chute du débit est suffisamment importante pour entraîner une hypoxie cellulaire, le métabolisme devient anaérobique. La production des composés riches en énergie (ATP et phosphocréatine notamment) est considérablement ralentie, ce qui provoque l'arrêt des fonctions cellulaires spécialisées. Moins de 30 secondes après une occlusion coronarienne, il se produit une chute du contenu cellulaire en phosphocréatine, suivi quelques minutes plus tard, d'une réduction de moitié de l'ATP cellulaire (Sobel, 1974 ; Jennings et Ganote, 1974). Selon le degré de l'occlusion artérielle, l'ischémie peut être :

- totale : lorsque la vascularisation est interrompue.
- sévère : lorsque le débit sanguin est très diminué. La mort cellulaire survient si l'ischémie se prolonge.
- ou modérée : lorsque le métabolisme cellulaire devient anaérobique, mais avec un débit sanguin suffisant pour permettre la survie cellulaire.

Résultant d'un défaut d'irrigation, l'ischémie provoque une accumulation locale des métabolites acides et s'oppose, de ce fait, à l'anoxie tissulaire au cours de laquelle l'apport d'oxygène est interrompu mais la vascularisation reste normale. La distinction entre ischémie et anoxie est importante pour l'identification des mécanismes biochimiques associés.

Finalement, dans un tissu ischémique ou anoxique, les comportements cellulaires sont très variables d'une cellule à l'autre. Les lésions peuvent rester longtemps réversibles, dépendant du milieu dans lequel baigne la cellule, de l'existence de vascularisations de suppléances ou d'une reperméabilisation ; Ainsi, il se crée une hétérogénéité biochimique et morphologique, variable dans le temps, qui rend difficile la compréhension des phénomènes globaux observés.

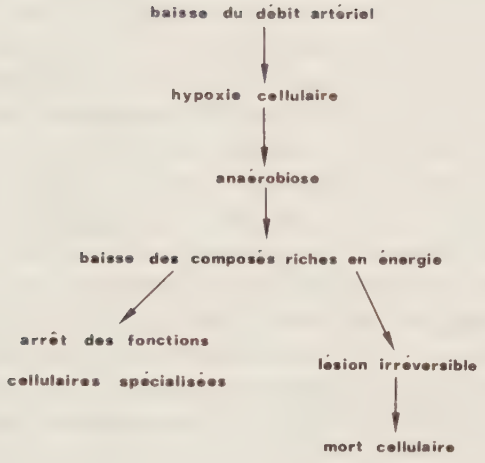


Figure 6 : **Schéma physiopathologique de l'ischémie tissulaire.**

Dès qu'il y a souffrance cellulaire, cérébrale ou myocardique, l'activité électrique locale change : moins de 20 secondes après le début d'une occlusion artérielle ou d'une anoxie, l'EEG (Ponten, 1973) ou l'ECG (Jennings et Ganote, 1974) se modifient, témoignant de perturbations des échanges ioniques.

Ces échanges ioniques sont importants non seulement pour l'activité cellulaire mais également pour l'homéostasie des liquides extracellulaires. Dans la pathogénèse des calcifications ectopiques, il est habituel d'opposer d'une part les calcifications dystrophiques qui surviennent dans un tissu pathologique, sans troubles de la calcémie ni de la phosphatémie, et, d'autre part, les calcifications métastasiques observées dans les tissus sains exposés à un environnement biochimique perturbé. Nous éliminerons de cette étude les métaplasies osseuses du

tissu conjonctif, de survenue rare dans le système nerveux central (Matthews et Moosy, 1974) et le myocarde, car le phénomène de calcification est plus général. Comme au niveau de l'os, le processus impliqué dans l'apparition de calcifications ectopiques nécessite la transformation des substances extracellulaires en une matrice organique calcifiable ainsi que des perturbations des transports ioniques cellulaires. La formation d'une matrice extracellulaire calcifiable requiert des conditions pathologiques favorisantes telles qu'une hypercalcémie, une hyperphosphatémie, un traitement par la vitamine D, une hypertension artérielle ou une élévation durable du taux de l'urée sanguine (Parfitt, 1969). Ainsi, lors d'expériences de microperfusions des tissus de l'oreille de lapin avec des solutions riches en calcium ou phosphates, l'apparition de cristaux d'hydroxyapatite ne dépend pas du produit ionique des ions calcium et phosphates de la solution de perfusion, mais de celui des ions non complexés par les protéines tissulaires. La capacité de fixation des ions calcium et phosphates par les protéines extracellulaires se trouve dépassée aux sites de minéralisation pathologique. Il faut des concentrations en calcium et phosphates dix fois supérieures aux concentrations plasmatiques normales pour que la matrice extracellulaire devienne calcifiable. L'hypoxie cellulaire, résultant d'une ischémie transitoire, diminue la résistance du tissu à l'hypercalcémie et prédispose, de ce fait, aux calcifications alors que les territoires de nécrose tissulaire, sans possibilités de revascularisation, ne se calcifiant pas (Urist et coll., 1971). Les cellules saines exercent donc une activité régulatrice à l'égard du milieu extracellulaire et protègent leur environnement.

En fait, des troubles des échanges ioniques apparaissent bien avant les calcifications macroscopiques. Dans ce qui suit, nous allons considérer

les critères biochimiques et ultrastructuraux accompagnant l'accumulation d'ions, essentiellement du calcium par la cellule.

2. Modifications métaboliques.

2.1. EN AEROBIOSE.

En aérobiose, l'orientation métabolique des cellules nerveuses et myocardiques est différente:

- le tissu nerveux n'est capable d'utiliser que le glucose comme combustible métabolique et exige un apport constant d'oxygène pour la combustion totale du glucose en CO_2 par le cycle des acides tricarboxyliques (Figure 7a). L'énergie libérée par ce mécanisme est utilisée pour la synthèse des esters phosphorés riches en énergie que sont l'ATP et la phosphocréatine. La première phase de ce métabolisme est anaérobique ; elle a lieu dans le cytoplasme et aboutit à la formation de deux molécules de pyruvate qui diffusent dans les mitochondries. La deuxième phase, intramitochondriale, est aérobique. Elle produit 36 moles d'ATP par mole de glucose, ce qui est 18 fois plus important que lors de la première phase. Ainsi, la glycolyse anaérobie ne peut à elle seule suffire à produire l'énergie nécessaire à une activité cérébrale normale (Cahill et Hoch, 1972 ; Ponten, 1973). De plus, les réserves cellulaires sont faibles car la synthèse de glycogène par le cerveau est peu importante (Vallejo et coll., 1971). L'apport de glucose et d'oxygène doit donc être permanent pour assurer une activité cérébrale normale.

- par des mécanismes qui ne sont pas encore complètement éclaircis, le myocarde métabolise de façon préférentielle les corps cétoniques (acétone, acetoacétate et β-hydroxybutyrate) puis les acides gras et en dernière ressource le glucose. (Figure 7b).

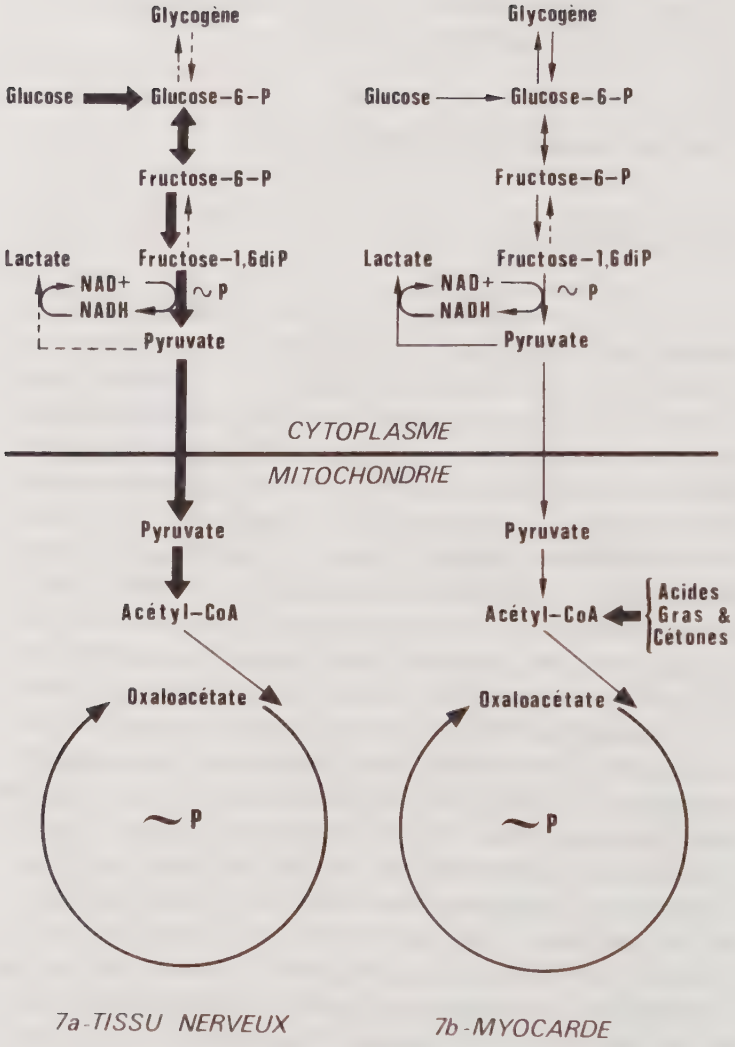


Figure 7 : **Voies métaboliques productrices d'énergie.**

Si les corps cétoniques ne sont pas disponibles et que la concentration d'acide gras est faible, le myocarde métabolise le glucose. Celui-ci est alors immédiatement dégradé en pyruvate et, si la quantité d'oxygène est adéquate, en CO_2 et en eau. A l'inverse, si les corps cétoniques et les acides gras sont en concentration suffisante, le catabolisme du glucose est minime et le glucose capté par le tissu est stocké sous forme de glycogène (Cahill et Hoch, 1972).

2.2. EN ANAEROBIOSE.

Au cours de l'anoxie tissulaire le citrate et l'ATP baissent, alors que les phosphates inorganiques s'élèvent. Ces différents composés sont des effecteurs allostériques de la phosphofructokinase. En anaérobiose cette enzyme se trouve donc activée, ce qui provoque une stimulation de la glycolyse. On observe également une captation accrue de glucose par la cellule, une activation de l'hexokinase et une transformation de la phosphorylase b en phosphorylase a active. Ces différentes modifications oeuvrent toutes dans le sens d'une augmentation de la glycolyse et permettent la survie cellulaire. En anaérobiose les glucides sont les seuls substrats oxydables, mais les besoins en ATP ne sont pas pleinement assurés par la glycolyse. L'utilisation des réserves énergétiques de la cellule est nécessaire, mais se trouve ralentie par l'augmentation de la glycolyse : l'échéance des lésions irréversibles est ainsi retardée.

Par contre, l'ischémie provoque une acidose lactique intracellulaire qui ralentit l'activité de la phosphofructokinase, donc la glycolyse. Les lésions deviennent ainsi plus rapidement irréversibles. Cependant, au niveau du cerveau, l'acidose locale influence le débit sanguin régional en modifiant les

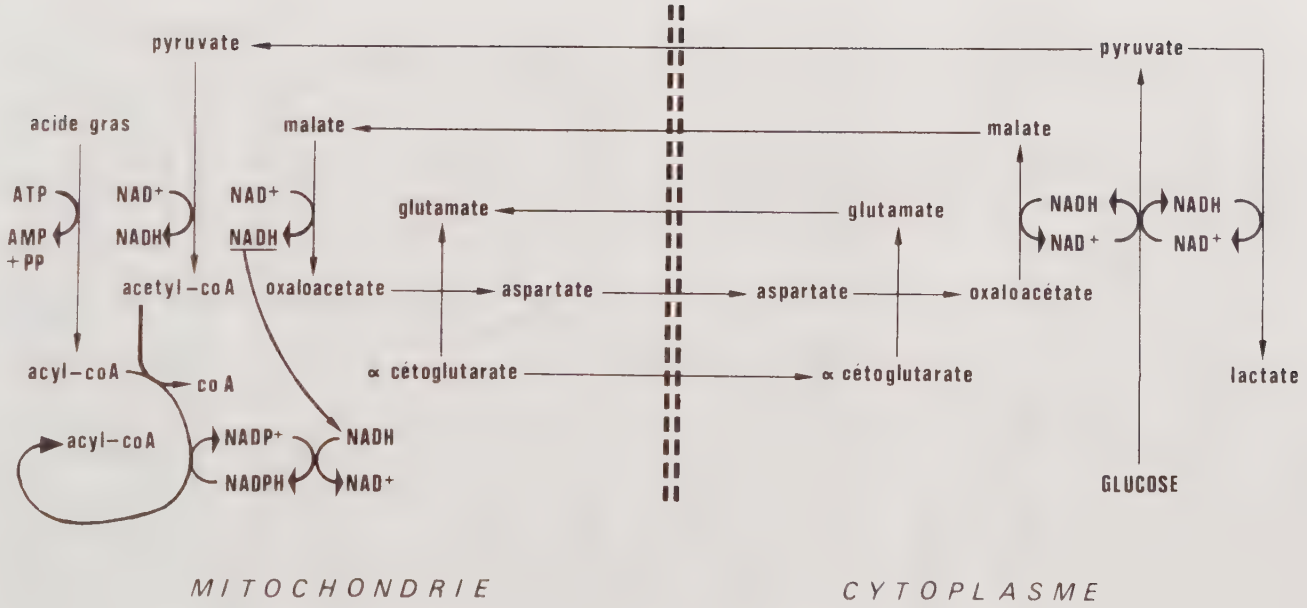


Figure 8 : **Voies métaboliques anaérobiques pouvant entretenir la glycolyse.**

résistances vasculaires. La perfusion tissulaire est ainsi hétérogène : certaines zones demeurent en ischémie sévère ou totale, d'autres zones deviennent normalement perfusées ou parfois même reçoivent une perfusion de luxe (Ponten, 1973).

Quelles que soient les conditions métaboliques la glycolyse libère dans le cytoplasme des cofacteurs des réactions de déshydrogénation sous forme réduite (NADH principalement). Le glycolyse ne peut continuer en l'absence de formes oxydées (NAD^+). Plusieurs voies (figure 8) permettent l'oxydation de NADH (Sobel, 1974) :

- la transformation du pyruvate en lactate est une première possibilité de régénération de NAD^+. L'acidose lactique observée au cours de l'ischémie myocardique reflète son importance.

- la voie du malate permet également à la cellule de transférer les hydrogènes à oxyder dans la mitochondrie. On sait en effet que le NADH ne peut traverser directement la membrane mitochondriale. Par contre, le malate, l'aspartate, le glutamate, l'α-cétoglutarate (mais pas l'oxaloacétate) peuvent traverser cette membrane. Il existe un cycle de réactions, s'effectuant en partie dans le cytoplasme, en partie dans la mitochondrie, au cours duquel le NADH cytoplasmique est oxydé alors que le NAD^+ mitochondrial se réduit.

- en anaérobiose le NADH intramitochondrial ne peut être oxydé par la phosphorylation oxydative. Le rapport $NADH/NAD^+$ s'élève. La synthèse réductive des acides gras, dont la régulation dépend de ce rapport, se trouve stimulée (Whereat et coll., 1967). Par cette voie, la cellule consomme du NADH et stocke provisoirement des résidus acétylés. Ceux-ci seront ultérieurement disponibles si le métabolisme redevient aérobique.

L'amorçage du processus nécessite une réaction initiale d'activation des acides gras. Cette réaction consomme une molécule d'ATP qui se décompose en AMP et pyrophosphate (PP). PP doit être en faible concentration pour que la réaction se produise.

L'entretien du processus suppose la décarboxylation du pyruvate et la formation d'acétyl-coenzyme A. Cette réaction est catalysée par une pyruvate déshydrogénase. Les mitochondries, isolées à partir de cellules myocardiques ischémiques, sont incapables de dégrader complètement le pyruvate, mais l'oxydation en acetyl-coenzyme A de ce substrat demeure possible en présence de malate et de coenzyme A réduit (Jennings et coll., 1969). De plus, le calcium et l'ATP sont des effecteurs allostériques de la pyruvate déshydrogénase, le premier en activant et le second en inhibant l'enzyme (Schuster et Olson, 1974b). Au cours d'une ischémie cellulaire, d'une part le niveau en ATP est faible et d'autre part le calcium s'accumule dans la matrice mitochondriale ; le résultat est une activation de la pyruvate déshydrogénase.

En fait, les modifications biochimiques responsables de l'arrêt des fonctions cellulaires spécialisées n'ont pas encore été clairement mises en évidence. (Sobel, 1974). En effet, l'atteinte fonctionnelle, cérébrale ou myocardique, précède la baisse de l'ATP. L'identification des mécanismes spécifiques des lésions ischémiques s'avère pourtant nécessaire. Elle fournirait une base théorique pour une conduite diagnostique et thérapeutique plus rationnelle. Le trouble primitif pourrait être une modification des transports ioniques, du calcium notamment, au niveau des sites membranaires. Un stade ultérieur serait l'apparition de lésions irréversibles, et, dans ce qui suit, nous allons rechercher des critères morphologiques traduisant cette irréversibilité.

3. Modifications morphologiques.

Des études ultrastructurales sur de nombreux modèles expérimentaux ont évalué les effets au niveau du cerveau et du myocarde de l'ischémie, de l'hypoxie, de l'anoxie ou de substances chimiques. De tous les organites intracellulaires, la mitochondrie est celui qui paraît le plus précocement et le plus intensément atteint par l'anaérobiose. D'une manière générale, une tuméfaction mitochondriale est la règle. Elle s'accompagne parfois de l'apparition dans la matrice de dépôts de phosphate tricalcique ou d'une substance amorphe. Dans ce qui suit nous allons examiner de façon plus détaillée certains protocoles expérimentaux afin de faire ressortir les conditions d'apparition de ces lésions.

3.1. DANS LE TISSU NERVEUX.

Les différents protocoles utilisés concernent l'hypoxie (Bakay et Lee, 1968), l'anoxie anoxique (Becker, 1961 et 1962 ; Baldy-Moulinier et coll., 1973), l'ischémie (Ibrahim, 1972 ; Dodson et coll., 1974 ; Garcia et Kamijyo, 1974), l'anoxie ischémique (Levine, 1960 ; Becker, 1961 et 1962 ; Khattab, 1967 ; Ibrahim, 1972 ; Brown et Brierley, 1969 et 1972 ; Baldy-Moulinier et coll. 1973), l'anoxie histotoxique (Lee et Bakay, 1965 ; Miyoshi, 1966; Shibasaki, 1969 ; Baldy-Moulinier et coll., 1973). Quel que soit le mécanisme responsable de la lésion, les astrocytes deviennent oedémateux, principalement au niveau de leurs prolongements périvasculaires, tandis que les corps cellulaires des neurones sont le siège d'une vacuolisation importante. Les vacuoles intraneuronales correspondent, dans la majorité des cas, à des mitochondries en voie de dégénerescence. Celles-ci sont dilatées et remplies d'une substance très peu dense aux électrons (Bakay

et Lee, 1968 ; Brown et Brierley, 1972 ; Dodson et coll., 1974). Par ailleurs, les mitochondries des astrocytes oedématiés sont morphologiquement normales (Pakay et Lee, 1968). Comme le cytoplasme des neurones lésés n'est pas turgescent, les modifications de leurs mitochondries semblent bien résulter de facteurs métaboliques actifs. En association avec ces altérations mitochondriales, on observe assez souvent des dilatations des tubules et des citernes du réticulum endoplasmique, qu'il soit granulaire ou non (Brown et Brierley, 1972).

Progressivement, le cytoplasme neuronal se condense entre les zones de dilatation, alors que les mitochondries se contractent et retrouvent leur taille normale ; les crêtes mitochondriales se reconstituent avec parfois des aspects ampulliformes. Le stade ultérieur d'incrustations correspond à l'isolement de zones denses par des zones plus transparentes aux électrons. A ce stade, des mitochondries très denses aux électrons sont présentes (Brown et Brierley, 1972).

3.2. DANS LE MYOCARDE.

Avant d'envisager les lésions myocardiques proprement dites, nous rappelerons que dans les muscles squelettiques le traumatisme local fait doubler le contenu calcique du muscle en moins de six heures. Parallèlement, le potassium musculaire décroît. Une néphrectomie bilatérale préalable accroît considérablement la quantité de calcium captée par le tissu lésé (Meroney et coll., 1957).

Au niveau du myocarde, différentes conditions expérimentales aboutissent à l'accumulation de calcium dans les territoires lésés. Les troubles les plus remarquables sont obtenus au cours d'anoxies aiguës transitoires, suivies d'une période de restauration du courant sanguin. Ainsi, une préparation

cardiaque isolée, perfusée en anaérobie pendant 30 minutes par un milieu sans glucose, puis réoxygénée pendant 30 minutes, consomme son glycogène et produit du lactate ; parallèlement, on observe en microscopie électronique une tuméfaction mitochondriale et une dilatation du système tubulaire longitudinal (Weissler et coll., 1968). De même, le clampage d'une artère coronarienne pendant 40 minutes, suivi d'une revascularisation pendant 20 minutes, provoque l'apparition de bandes contractiles intracytoplasmiques, une tuméfaction mitochondriale et l'accumulation dans les mitochondries de calcium sous forme de granules denses et de lipides sous forme de dépôts amorphes. Dans de telles conditions, 50 p.cent environ des cellules myocardiques sont lésées (Shen et Jennings, 1972a ; Jennings et Ganote, 1974).

Par contre, une ischémie permanente n'est pas suivie de perturbations dans la répartition du calcium tissulaire.

Au cours des 24 premières heures d'un infarctus, le calcium ne s'accumule pas, excepté à la périphérie des tissus nécrosés. L'administration intrapéritonéale d'isoprénaline à la dose de 5mg/kg provoque des foyers de nécrose myocardique. En microscopie électronique, les modifications ultrastructurales n'affectent que certaines cellules tandis que les cellules environnantes paraissent indemnes. Dans les cellules lésées, des bandes contractiles apparaissent très précocement (2 à 4 mn après l'injection) et le glycogène est consommé. Les mitochondries de ces mêmes cellules apparaissent d'abord tuméfiées (2 à 4 mn) puis se chargent en granules denses et retrouvent leur taille normale (8 mn). A la 8e heure, les cellules pathologiques sont fragmentées et éliminées par des macrophages ; les structures denses en microscopie électronique se retrouvent à l'intérieur de ces derniers (Bloom et Cancilla, 1969).

De façon comparable, l'association de 9 α-fluorocortisol et de phosphate de sodium provoque l'apparition de foyers de nécrose myocardique. Dans les cellules en voie de dégénérescence, les mitochondries sont chargées de granules denses, alors que le glycogène cellulaire s'appauvrit. Ces troubles s'observent du 4e au 14e jour après le début de l'expérience et sont intenses vers le 6e jour (d'Agostino, 1964).

Sur le plan clinique, l'association de calcifications myocardiques et d'un processus pathologique conduisant à une nécrose a été observé en microscopie optique par Gore et Arons (1949). Les foyers de calcifications se situent dans des zones de nécrose récente et, de préférence, en périphérie de ces dernières. L'ischémie est également le facteur principal en cause dans les cas de calcifications accélérées constatées après chirurgie cardiovasculaire (Hermann et coll., 1963 ; Reichenbach et Benditt, 1968, d'Agostino et Chiga, 1970). En microscopie électronique, des granules denses intramitochondriaux (Reichenbach et Benditt, 1968 ; d'Agostino et Chiga, 1970), probablement phosphocalciques, traduisent la souffrance cellulaire. Associée à la minéralisation mitochondriale, une dégénérescence des fibres myocardiques a été décrite (Reichenbach et Benditt, 1968). Elle se caractérise par une segmentation du cytoplasme par des bandes transversales. Dans les infarctus myocardiques, ces modifications mitochondriales et myofibrillaires se localisent dans un territoire d'épaisseur variable, à cheval entre le tissu sain et le tissu nécrosé (Reichenbach et Benditt, 1968).

III. CONCLUSIONS.

Une grande partie de l'énergie libérée par le catabolisme cellulaire est mise en réserve sous forme d'ATP par les mitochondries au cours de la phosphorylation oxydative. La création de gradients ioniques constitue une autre forme de conservation de l'énergie. Dans les conditions aérobiques habituelles, le système enzymatique mitochondrial est orienté vers la phosphorylation ; par contre, au cours de l'hypoxie cellulaire, l'enrichissement du cytoplasme en calcium favorise l'accumulation de calcium et de phosphates par les mitochondries.

Sur le plan physiopathologique, l'orientation préférentielle de l'activité mitochondriale vers des transports ioniques serait réalisée lorsque le milieu intracellulaire est perturbé par une hypoxie tandis qu'une vascularisation suffisante permet l'apport des métabolites. Le pyrophosphate pourrait accompagner les phosphates et le calcium et se concentrer dans les granules denses intramitochondriaux. La persistance de transports actifs dans les territoires hypoxiques prouve que les chaines respiratoires motochondriales peuvent rester longtemps intactes. Cependant, l'incapacité des cellules à maintenir, lors des revascularisations, un volume et une concentration en calcium corrects plaide en faveur de l'irréversibilité des lésions (Jennings et Ganote, 1974). L'apparition dans la matrice mitochondriale d'une substance amorphe, formée essentiellement de lipides, est également caractéristique de lésions cellulaires irréversibles.

Finalement, reflétant les troubles du métabolisme phosphocalcique cellulaire, l'accumulation de pyrophosphate dans les cellules serait possible. Elle serait alors plus intense lorsque les lésions cellulaires sont devenues irréversibles. La

mise en jeu de suppléances à partir des tissus sains environnants ou la reperméabilisation des territoires ischémiés faciliterait la concentration du phosphate tricalcique et du pyrophosphate.

CHAPITRE QUATRIEME

I - NOTIONS TECHNIQUES
- 1. Voies d'administration
- 2. Pecueil des informations

II - BASES BIOLOGIQUES DE L'EXPLORATION ISOTOPIQUE CEREBRALE
- 1. Les modifications du compartiment vasculaire
- 2. L'augmentation de la perméabilité capillaire
- 3. Les troubles des espaces extracellulaires
- 4. Les perturbations du métabolisme cellulaire
- 5. Conclusions

III - BASES BIOLOGIQUES DES EXPLORATIONS ISOTOPIQUES EN CARDIOLOGIE
- 1. Les traceurs captés par le myocarde sain
- 1.1 - Le potassium et ses homologues
- 1.2 - Les autres produits radiopharmaceutiques
- 2. Les traceurs captés par le myocarde pathologique
- 3. Conclusions

IV - LE PYROPHOSPHATE STANNOTECHNETIE ET SES HOMOLOGUES DANS LES ACCIDENTS VASCULAIRES CEREBRAUX ET MYOCARDIQUES
- 1. L'exploration du système nerveux central
- 2. L'exploration du myocarde
- 3. Les autres localisations extraosseuses

V - CONCLUSIONS

CHAPITRE QUATRIEME

EXPLORATION ISOTOPIQUE DES ACCIDENTS VASCULAIRES CEREBRAUX ET MYOCARDIQUES.

Dans le présent chapitre, nous nous proposons tout d'abord de rappeler quelques aspects concernant l'utilisation des traceurs en exploration cérébrale et myocardique ; ceci nous permettra de comprendre la nécessité de rechercher de nouvelles molécules ayant une sélectivité accrue non pour un organe précis, mais pour un type de lésions. Puis, nous présenterons l'intérêt du pyrophosphate stannotechnétié et de ses homologues pour l'exploration des lésions d'origine ischémique.

I. NOTIONS TECHNIQUES.

1. Voies d'administration.

Le système nerveux central et le coeur sont explorés après injection intraveineuse. Pour certains examens complémentaires, on peut être amené à choisir d'autres voies, mais celle-là présente l'avantage de rester atraumatique.

Une prémédication de protection par un composé stable est à envisager. Ainsi, pour le pertechnétate ^{99m}Tc, l'administration *per os* de 150 à 200 mg de perchlorate de potassium, quelques minutes avant l'injection du traceur, empêche la thyroïde et les glandes salivaires de capter le pertechnétate libre circulant.

2. Recueil des informations.

L'instrumentation choisie est de deux types. Ce sont :

- soit des scintigraphes conventionnels à balayage linéaire et rectiligne qui enregistrent l'activité point par point en se déplaçant au-dessus de l'organe ou de la zone d'interêt,
- soit des détecteurs stationnaires, du type caméra à scintillations, qui enregistrent une activité globale mais permettent une visualisation sur écran d'oscilloscope de la distribution spatiale des signaux.

Ce deuxième dispositif présente l'avantage d'une plus grande souplesse d'utilisation, avec possibilités d'études dynamiques. La visualisation de la distribution de la radioactivité est alors mise en oeuvre de suite après injection rapide de l'embol radioactif (gamma-angio-encéphalographie et gamma-angio-cardiographie). Un dispositif de traitement de l'information avec enregistrement sur support magnétique des phénomènes en fonction du temps autorise une analyse ultérieure des données. C'est ainsi que peuvent être obtenues des courbes de transit en regard de zones particulièrement intéressantes (Planiol, 1971 ; Floyrac, 1972).

II. BASES BIOLOGIQUES DE L'EXPLORATION ISOTOPIQUE CEREBRALE.

La caractéristique de la scintigraphie cérébrale est la faible fixation de presque tous les traceurs par le tissu normal. Par contre, une lésion se manifeste, dans la grande majorité des cas, comme une zone hyperactive. De nombreux mécanismes ont été proposés pour expliquer le comportement particulier du tissu cérébral normal et la formation de l'image pathologique. Nous les regroupons en :

- modifications du compartiment vasculaire,
- augmentation de la perméabilité capillaire,
- troubles des espaces extracellulaires,
- perturbations du métabolisme cellulaire.

1. Les modifications du compartiment vasculaire.

Le calibre des vaisseaux, l'existence de shunts, la présence de néovaisseaux ou, au contraire, l'oblitération des gros vaisseaux, ou l'apparition d'une zone avasculaire sont autant de paramètres dont on doit tenir compte. En effet:

1.1 - En premier lieu, ils modifient la phase circulatoire ; les techniques d'examen dynamique (gamma-angio-encéphalographie) objectivent certaines de ces lésions par une hyperactivité localisée (anevrysmes artérioveineux, méningiomes), d'autres par une hypoactivité (thrombose d'un gros tronc artériel, hématome intracérébral) ; enfin d'autres lésions sont diffuses, ne donnant qu'un aspect de ralentissement circulatoire (insuffisance circulatoire cérébrale).

1.2 - Ultérieurement (scintigraphies et vues statiques), ils modifient le pool sanguin local et, dans la mesure où le radiocomposé persiste dans le compartiment vasculaire, celui-ci contribuera à l'hyperactivité dans le territoire en regard.

2. L'augmentation de la perméabilité capillaire.

En 1921, Stern emet l'hypothèse de "l'existence d'un mécanisme spécial réglant le passage de diverses substances du sang dans le liquide céphalorachidien et dans les centres nerveux cérébrospinaux", mécanisme auquel elle donne le nom de "barrière hématoencéphalique". Depuis lors, malgré les nombreux travaux qui lui ont été consacré, le phénomène de "barrière" n'a jamais pu être complètement défini. Il est considéré actuellement, non plus comme une barrière contre les substances toxiques en circulation dans le sang, mais plutôt comme un mécanisme de régulation des échanges entre le sang et le parenchyme cérébral, assurant ainsi l'homéostasie du système nerveux central.

Plusieurs processus contribuent aux échanges "sang-tissu cérébral", et, parmi ceux-ci, la diffusion passive, les transferts actifs et la pinocytose ont été mis en évidence dans le cerveau normal. Le tissu glial apparaît comme l'élément cellulaire régulateur de ces échanges.

2.1. LA DIFFUSION PASSIVE.

Elle se fait à l'inverse d'un gradient de concentration, tendant à le diminuer.

Les substances hydrosolubles cheminent au travers de pores. Toutefois, la preuve histologique de ces derniers est mal établie au niveau des capillaires cérébraux normaux. En outre, la membrane

basale particulièrement bien développée laisse supposer que le mécanisme de filtration à travers des pores a peu d'importance dans le tissu cérébral sain.

Au contraire, les substances liposolubles diffusent librement à travers les membranes qu'elles rencontrent.

2.2. LES TRANSFERTS ACTIFS.

Le métabolite lié à un transporteur peut diffuser à travers les membranes et cette diffusion est de même sens que le gradient de concentration, tendant à le renforcer. L'énergie requise par le processus est fournie par le métabolisme cellulaire. Un tel mécanisme a été prouvé pour le glucose et certains acides aminés (Lajtha, 1964).

2.3. LA PINOCYTOSE.

Découverte de la microscopie électronique, la pinocytose est un mécanisme permettant le transport de grosses molécules qui se trouvent d'abord captées, puis entourées par la membrane cellulaire, et enfin sont incluses dans le cytoplasme endothélial.

2.4. LE ROLE DU TISSU GLIAL.

Sur le plan histologique, l'endothélium capillaire joue un rôle important dans le phénomène de la "barrière hémato-encéphalique" mais il n'est pas le seul élément cellulaire en cause ; il exerce en effet son action en liaison avec le tissu glial. La sélection des métabolites est effectuée par l'endothélium qui en assure le transport jusqu'à la membrane basale, siège de récepteurs enzymatiques. Les astrocytes, étroitement liés aux capillaires, assument le rôle de réserve pour la plupart des métabolites et également de transport, soit vers les

neurones, soit vers le sang, suivant les nécessités du métabolisme cérébral. Les oligodendrocytes, de leur côté, interviennent essentiellement dans la synthèse et l'entretien des gaines de myeline alors que la microglie a un rôle de phagocytose (Gonsette, 1972).

2.5. ASPECTS OBSERVES DANS LES TISSUS PATHOLOGIQUES.

Au niveau d'une lésion, le phénomène de "barrière hématoencéphalique" est perturbé et les échanges entre le sang et les tissus pathologiques peuvent devenir comparables à ceux que l'on observe dans d'autres tissus normaux de l'organisme, exclusion faite d'éventuelles participations métaboliques.

En microscopie électronique, des pores et des discontinuités de la membrane basale ont été observés dans les tissus tumoraux. De plus, le phénomène de pinocytose est plus important, par le nombre et la taille des vésicules, dans les gliomes et le tissu nerveux traumatisé. La serum-albumine humaine, utilisée comme traceur, est retrouvée dans les vésicules pinocynotiques de gliomes humains (Bakay, 1969 ; Raimondi, 1964 et 1969). Le développement en surface de l'endothélium capillaire est variable selon le degré de malignité (Nyström, 1960), modifiant ainsi la surface d'échange sang-tissu et l'importance quantitative des mécanismes de transfert.

3. Les troubles des espaces extracellulaires.

3.1. LE TISSU CEREBRAL NORMAL.

La microscopie électronique met en évidence des espaces intercellulaires très étroits dans le tissu cérébral normal, avec cependant quelques

différences entre cortex et substance blanche. Chez le rat et le chat, Lee et Bakay (1965) rapportent un espace intercellulaire de 200 Å dans la substance grise et de 200 à 800 Å dans la substance blanche. Certains auteurs, se basant sur l'étroitesse des espaces intercellulaires, suggèrent que les substances n'ont aucun espace de diffusion disponible, ce qui expliquerait le phénomène de la "barrière hématoencéphalique" (Gonsette, 1972).

3.2. LE TISSU PATHOLOGIQUE ET L'ŒDEME CEREBRAL.

Différents sont les espaces extracellulaires des tissus pathologiques. Hossmann (1967) les trouve élargis et remplis d'un liquide dont la composition chimique est mal connue. La présence de ferritine et d'albumine dans ce liquide (Lee et Bakay, 1966) témoigne de l'existence de troubles de la perméabilité.

Sur les plans clinique et physiopathologique, l'oedème cérébral est le trouble majeur des espaces extracellulaires. Cependant, histologiquement, on considère que l'imprégnation hydrique intéresse principalement les astrocytes au niveau de la substance grise, alors que la diffusion intercellulaire ne s'observe qu'au niveau de la substance blanche (Lee et Bakay, 1966). L'oedème ne se localise donc pas uniquement dans les espaces intercellulaires. De plus, l'oedème peut s'étendre au-delà du tissu lésé, gagnant ainsi le cerveau sain adjacent comme en témoignent les fixations élevées des radiocomposés dans les deux territoires (Bakay, 1969, Plaziol, 1971). Le rôle des oedèmes lésionnel et périlésionnel dans la constitution d'un foyer d'hyperactivité est donc capital.

4. Les perturbations du métabolisme cellulaire.

Des troubles métaboliques sévères accompagnent les lésions cérébrales. Cependant, la fixation des traceurs habituellement utilisés dans l'exploration du S.N.C. ne reflète pas les particularités propres à chacun de ces troubles. La concentration de la serum-albumine humaine ou du pertechnétate dans les parenchymes pathologiques dépend essentiellement de mécanismes passifs, et les différences de comportement de ces traceurs sont surtout la conséquence de leurs propriétés physico-chimiques différentes (poids moléculaire du traceur comparé à la taille des pores capillaires, état ionique du traceur...).

Il paraît donc souhaitable de rechercher des composés dont le mécanisme de concentration dépende non seulement de leurs caractères physico-chimiques mais également du métabolisme tissulaire.

5. Conclusions.

Les produits radiopharmaceutiques utilisés dans l'exploration du S.N.C. ne peuvent diffuser librement dans le tissu cérébral sain. Par contre, ils se concentrent dans diverses formations pathologiques intracraniennes, qu'elles soient tumorales, ischémiques, inflammatoires ou traumatiques. Des propriétés physico-chimiques différentes se traduisent par des hyperactivités d'aspect différent, mais l'hyperactivité du tissu cérébral lésé est du même ordre de grandeur que l'activité de différents tissus parenchymateux de l'organisme : foie, rein, etc... (Tator, 1969). L'apparente concentration des traceurs dans le parenchyme cérébral pathologique s'explique donc beaucoup plus par un bruit de fond très faible

dans le tissu sain que par une accumulation exagérée dans la lésion (Bakay, 1969).

La recherche d'une amélioration de la qualité du diagnostic peut s'orienter soit vers l'analyse des troubles dynamiques, révélant ainsi l'architecture du tissu lésé, soit vers l'utilisation de radiocomposés ayant un tropisme accru pour certains désordres métaboliques.

III. BASES BIOLOGIQUES DES EXPLORATIONS ISOTOPIQUES EN CARDIOLOGIE.

Le coeur est un muscle creux dont l'exploration scintigraphique peut être orientée vers la visualisation soit des cavités soit du myocarde. Nous nous limiterons à la scintigraphie du myocarde et distinguerons les traceurs captés par le myocarde sain, parmi lesquels le potassium et ses homologues, et les traceurs captés par le myocarde pathologique.

1. Les traceurs captés par le myocarde sain.

1.1. LE POTASSIUM ET SES HOMOLOGUES.

Les cellules myocardiques saines concentrent le potassium et ses homologues alcalins, le rubidium et le césium. Le mécanisme de captation dépend de plusieurs facteurs, dont :

- un apport suffisant du métabolite par la circulation coronaire,
- l'intégrité des mécanismes intracellulaires de concentration ionique,
- l'intégrité des membranes cellulaires.

La perte du pouvoir de concentration du potassium est observée dans les ischémies aiguës et les nécroses myocardiques. Sur les scintigraphies,

ces lésions prennent l'aspect de zones plus "froides" (c'est-à-dire moins riches en radioactivité) que le myocarde sain.

De nombreux isotopes du potassium et de ses homologues ont été proposés. C'est ainsi que furent étudiés les fixations myocardiques du ^{84}Rb, du ^{86}Rb, du ^{42}K, du ^{131}Cs, puis ultérieurement du ^{43}K, du ^{129}Cs et du ^{81}Rb (Carr et coll., 1962a ; Carr et coll., 1964 ; Love et coll., 1968 ; Yano et coll., 1970 ; Poe et coll., 1972 ; Poe et coll., 1973a ; Lamb et coll., 1974). Malgré une faible énergie (29,4 keV) et une période relativement longue (9,9 jours pour la période physique et 2 mois pour la période biologique), le césium 131 est l'isotope le plus couramment utilisé avec des résultats cliniques intéressants (McGeehan et coll., 1968) ; Brochier et coll., 1971 ; Planiol et coll., 1971 ; Planiol, 1972). Chez le sujet normal, les scintigraphies faites une heure après l'injection reflètent surtout l'activité du ventricule gauche et du septum, les autres régions cardiaques ne participant que faiblement à la constitution de l'image. L'infarctus est objectivé par une lacune plus ou moins étendue, alors que l'ischémie sans nécrose ne donne qu'une hypofixation plus ou moins marquée.

Les résultats obtenus avec ce type de traceurs sont encourageants ; cependant, il existe des limites à leur utilisation à des fins diagnostiques. Ainsi :

- l'énergie du césium 131 est faible et sa couche de demi-absorption n'est que de 2,5 cm dans les tissus mous. De ce fait, la contribution de la paroi postérieure à la radioactivité globale est faible (10 à 20 p. cent) (Planiol, 1972). Les infarctus postérieurs sont donc moins faciles à mettre en évidence avec ce traceur que les antérieurs. Le ^{43}K, le ^{129}Cs et le ^{81}Rb ont été proposés pour pallier cet inconvénient. Ils ne peuvent cependant être utilisés

facilement, car ils sont produits par des cyclotrons.

- dans les cas où sont associés une dilatation cavitaire et un infarctus antérieur, le pool sanguin situé en arrière du territoire infarci est important et la radioactivité circulante qu'il contient peut masquer l'image d'infarctus. On a donc intérêt à choisir des traceurs dont la clearance sanguine est rapide, ce qui diminue la radioactivité circulante au moment de l'examen. Néanmoins, il faut que la captation par le myocarde sain soit suffisante et celle-ci dépend de la concentration sanguine en traceur.

- les nécroses myocardiques irréversibles, visualisées à la phase aigüe, n'ont pas toujours l'aspect franchement lacunaire des cicatrices anciennes. L'aspect peut être celui d'une hétérogénéité de distribution diffuse ; il diffère donc peu de celui d'une ischémie sans nécrose.

1.2. LES AUTRES PRODUITS RADIOPHARMACEUTIQUES.

D'autres molécules ont été proposées pour visualiser le myocarde sain. Les résultats obtenus avec celles-ci ne sont souvent qu'expérimentaux et il n'a pas été prouvé que les différents produits radiopharmaceutiques essayés étaient supérieurs au césium 131. Nous citerons donc pour mémoire :

- l'ion ammonium marqué par ^{13}N (Harper et coll., 1972 et 1973)

- le bleu de toluidine (King, 1969 ; Carr et coll., 1972)

- les acides gras (Evans et coll., 1965; Bonte et coll., 1973 ; Poe et coll., 1973b, Robinson et coll., 1974b). Rappelons que ces derniers sont utilisés comme combustible par le métabolisme oxydatif du myocarde sain.

2. Les traceurs captés par le myocarde pathologique.

Des images "en positif" d'une lésion myocardique seraient préférables à des zones "froides" pour le diagnostic de lésion, sinon pour le diagnostic topographique. Une hyperactivité entourée de bruit de fond est en effet plus facilement objectivée qu'une lacune cernée de tous côtés par une hyperactivité.

Un certain nombre de produits radiopharmaceutiques se concentrent dans les nécroses myocardiques récentes. C'est le cas pour :

- la néohydrine marquée par ^{203}Hg (Carr et coll., 1963) et le citrate de gallium marqué par ^{67}Ga (Kramer et coll., 1972). Cependant, ces composés ne sont pas spécifiques de la nécrose myocardique et les propriétés physiques de leurs radioéléments sont peu intéressantes.

- le glucoheptonate marqué par ^{99m}Tc proposé par Rossmann et coll., (1974) et Zweiman et coll., (1974).

- les tétracyclines. Leur fluorescence avait permis de montrer leur accumulation dans divers tissus nécrotiques, d'origine ischémique ou tumorale (Rall et coll., 1957 ; Philips et coll., 1960 ; Kantor et coll., 1961 ; McLeay et coll., 1958 ; Whitmore et coll., 1964), et notamment l'infarctus myocardique (Malck et coll., 1963), ainsi que dans l'os au niveau des zones de croissance osseuse (Milch et coll., 1958 ; Harris et coll., 1962). Le mécanisme de leur concentration n'est pas encore complètement élucidé mais une fixation des tétracyclines sur le calcium est possible (Myers et Goldstein, 1974). Récemment, le marquage des tétracyclines par le technétium 99m a rendu possible leur utilisation en clinique pour le diagnostic des nécroses myocardiques récentes (Dewanjee et coll., 1972 ; Dewanjee et Prince, 1973 et 1974 ; Holman et Dewanjee, 1973 ; Holman et coll., 1974a et b).

- le pyrophosphate stannotechnétié (Bonte et Parkey, 1974).

3. Conclusions.

Les isotopes du potassium et de ses homologues n'objectivent qu'indirectement le territoire myocardique infarci. En effet, le tissu nécrosé perd son pouvoir de concentration à l'égard du potassium. Le trouble est définitif et les isotopes de ce type ne permettent pas de suivre l'évolution d'un infarctus.

Tout différent est le mode de visualisation "en positif" obtenu avec les tetracyclines et le pyrophosphate. Marqués tous les deux par le technétium 99m, ces produits radiopharmaceutiques paraissent prometteurs. Leur concentration est importante dans les nécroses récentes ; mais, ultérieurement, les séquelles de nécroses ne les captent plus. Ceci est intéressant car on peut espérer utiliser ces traceurs non seulement pour le diagnostic d'infarctus récent mais également pour suivre l'évolution de la lésion.

IV. LE PYROPHOSPHATE STANNOTECHNETIE ET SES HOMOLOGUES DANS LES ACCIDENTS VASCULAIRES CEREBRAUX ET MYOCARDIQUES.

1. L'exploration du système nerveux central.

L'idée d'employer des dérivés phosphatés pour l'exploration cérébrale est ancienne. En effet, le phosphate, marqué par le phosphore 32, a été largement utilisé dans le passé,pour étudier, à l'aide d'autoradiographies, la perméabilité capillaire cérébrale et ses modifications lors d'anoxies, d'états de choc, ou dans les lésions produites par le froid ou les ultrasons (Bakay et coll. 1956 ; Bakay, 1957 ; Bakay et coll., 1959 ; Otomo et

Michaelis, 1960 ; Bakay et Haque, (1964). L'emploi de ces traceurs fut cependant limité par les propriétés physiques du radicélément ne permettant qu'une détection à crâne ouvert (Steinberg et Selverstone, 1950 ; Selverstone et Moulton, 1957).

La multiplicité des traceurs actuellement disponibles rend possible des explorations scintigraphiques itératives avec des composés chaque fois différents. Ainsi dans les cas difficiles où l'examen cérébral de routine n'oriente pas suffisamment le diagnostic, un deuxième examen avec un traceur à concentration osseuse préférentielle faciliterait la distinction entre lésions proprement cérébrales et tumeurs osseuses ou volets opératoires. Utilisés dans ce but par Tow et Wagner (1967), le pertechnétate-^{99m}Tc et le strontium-^{87m}Sr permettent de différencier les tumeurs de la boîte crânienne des tumeurs malignes intracrâniennes. Ces auteurs remarquent cependant que les deux traceurs s'accumulent de façon identique dans un cas de méningiome et quatre cas d'accidents vasculaires cérébraux. Plus récemment, Jones et coll., (1973 et 1974) étudiant 19 cas de tumeurs malignes intracérébrales ou osseuses, concluent aux concentrations préférentielles du pertechnétate dans les lésions intracérébrales et des polyphosphates dans les tumeurs osseuses.

Il apparaît ainsi que les polyphosphates se concentrent peu dans les tumeurs malignes du tissu nerveux. Par contre, Grames et Jansen (1973) rapportent 3 cas de ramollissements cérébraux dans lesquels le pertechnétate-^{99m}Tc et les polyphosphates-^{99m}Tc s'accumulent de façon comparable.

Ces résultats sont confirmés par Wenzel et Heasty (1974). Ceux-ci constatent d'une part une faible fixation des polyphosphates dans deux cas de tumeurs malignes intracrâniennes et, d'autre part, une fixation des polyphosphates-^{99m}Tc plus importante

que celle du pertechnétate-99mTc dans deux cas de ramollissements. Dans ces deux derniers cas, les lésions sont récentes (9 jours et 14 jours) et, l'artériographie carotidienne pratiquée dans 1 cas visualise une bonne vascularisation de suppléance. Ces auteurs envisagent la possibilité d'utiliser les polyphosphates stannotechnétiés pour le diagnostic des ramollissements cérébraux.

Les résultats publiés depuis concernant toujours des petits nombres de cas, mais l'ensemble des auteurs insiste sur l'importance de la concentration des dérivés phosphorés dans certains accidents vasculaires cérébraux. Ainsi, Moretti et coll., (1974) rapportent un cas de ramollissement objectivé par le pyrophosphate stannotechnétié. Fischer et coll., (1974) montrent qu'un diphosphonate se concentre plus fortement que le pertechnétate dans 3 cas sur 4 de ramollissements, mais aussi dans 4 cas sur 6 de méningiomes. De façon comparable, Planiol et coll., (1974) observent une fixation du pyrophosphate supérieure à celle du pertechnétate dans 7 cas sur 8 de lésions ischémiques et dans 1 cas sur 4 de méningiomes. Par contre, sur 37 malades examinés successivement à l'aide de pertechnétate et de pyrophosphate, Matsui et coll., (1974) ne rapportent que 3 cas d'accidents vasculaires cérébraux dans lesquels PP-Sn-Tc se concentre fortement.

Le pyrophosphate stannotechnétié et ses homologues sont donc capables de s'accumuler dans les ramollissements cérébraux et, à des degrés moindres, dans les méningiomes. Les corrélations anatomocliniques sont encore insuffisantes pour expliquer pourquoi certains ramollissements captent très fortement PP-Sn-99mTc alors que d'autres ne sont que faiblement visualisés par ce traceur. Un processus actif de concentration, avec participation du métabolisme cellulaire, est envisageable.

2. L'exploration du myocarde.

L'utilisation de PP-Sn-^{99m}Tc pour le diagnostic des infarctus myocardiques récents a été proposée par Bonte et Parkey (1974). L'étude expérimentale a été menée sur des chiens chez lesquels une embolie de l'artère coronaire gauche était créée par injection de 0,1 ml de mercure métallique. L'infarctus est visible de la 24e heure au 6e jour puis régresse et disparaît totalement vers le 14e jour.

L'étude clinique faite par ces auteurs rapporte 100 cas dont 45 infarctus prouvés par des modifications électrocardiographiques et enzymatiques. Les scintigraphies sont positives chez les 39 malades examinés dans les 6 premiers jours suivant leur infarctus. Les scintigraphies négatives concernent soit des malades chez lesquels l'infarctus n'a pu être affirmé par l'ECG et les dosages enzymatiques (Parkey, 1974 ; Parkey et coll., 1974) ; Meyer et coll., 1974). Entre le 8e et le 14e jour suivant l'infarctus, la lésion est plus difficile à mettre en évidence car la fixation de PP-Sn-^{99m}Tc dans le myocarde lésé est plus faible et se trouve masquée par une forte activité costale et chondrocostale. Un examen scintigraphique réalisé entre 30 et 60 minutes après l'injection est recommandé afin d'éviter une trop importante activité squelettique, tout en assurant une fixation suffisante sur la lésion myocardique. Afin de soustraire l'activité squelettique et le bruit de fond, Stokely et coll. (1974) proposent un traitement mathématique des images. Cependant, ce procédé présente l'inconvénient de nécessiter un ensemble de stockage de l'information sur support magnétique, à proximité du lieu d'examen. Or, les malades atteints d'infarctus récents ne peuvent être mobilisés sans danger, et, il apparaît impératif de déplacer l'ensemble de traitement de l'information vers l'unité de soins coronariens.

Signalons enfin que la fixation myocardique des polyphosphates stannotechnétiés ne se limite pas aux infarctus récents, mais qu'elle peut s'observer dans d'autres situations pathologiques comme les contusions thoraciques avec atteinte myocardique (Go et coll., 1974).

3. Les autres localisations extraosseuses.

La possibilité de localisations extraosseuses des traceurs à "tropisme osseux" est bien documentée pour ce qui concerne le strontium, principalement dans les poumons et le foie (Schall et coll., 1971 ; Chaudhuri et coll., 1972 et 1973 ; Adiseshan, 1973 ; Yeh, 1974).

Des faits analogues ont été récemment décrits pour PP-Sn-99mTc et ses homologues (Pendergrass et coll., 1973 ; Chaudhuri, 1974 ; Brower et Teates, 1974). Deux localisations sont plus particulièrement intéressantes à signaler : d'une part, les lésions articulaires dans lesquelles une importante captation par les tissus mous périarticulaires, y compris les muscles, a été décrite (Büll et coll., 1974) ; d'autre part, au niveau des seins dans les carcinomes examinés aussi bien avant traitement (Friedman et coll., 1974) qu'après mastectomie (Friedman et coll., 1974 ; Isitman et coll. 1974).

V. CONCLUSIONS.

La sérum-albumine et le pertechnétate, utilisés de routine pour l'exploration cérébrale, se concentrent dans les tissus nerveux pathologiques selon des mécanismes non spécifiques faisant surtout intervenir le pool vasculaire local et les troubles de la perméabilité capillaire. L'intérêt du

pyrophosphate stannotechnétié pour le diagnostic des ramollissements cérébraux provient de sa captation par ces lésions beaucoup plus importante que celle des traceurs de référence. Certains méningiomes se montrent aussi capables de fixer à un degré moindre le pyrophosphate. La participation des troubles métaboliques accompagnant l'anoxie cérébrale au processus de concentration du pyrophosphate est envisagée par certains auteurs mais reste encore à prouver.

Au niveau du myocarde, le pyrophosphate stannotechnétié se fixe dans les infarctus récents, c'est-à-dire examinés avant le septième jour d'évolution. L'intérêt de l'image obtenue est son aspect en "positif" qui l'oppose aux scintigraphies faites avec les isotopes radioactifs du potassium et de ses homologues. Cependant, la fixation du traceur est également importante dans les parties osseuses de la cage thoracique, ce qui constitue une gêne importante pour l'interprétation des images.

CHAPITRE CINQUIEME

I - L'EXPLORATION CEREBRALE
- 1. Méthode
- 2. Résultats
- 3. Exemples

II - L'EXPLORATION MYOCARDIQUE
- 1. Méthode
- 2. Résultats

III - CONCLUSIONS

CHAPITRE CINQUIEME

RESULTATS OBTENUS DANS L'EXPLORATION CEREBRALE ET MYOCARDIQUE.

Pour chaque organe, l'étude a été comparative, chaque malade recevant successivement le pyrophosphate et le traceur de référence : pertechnétate (^{99m}Tc) pour le cerveau et chlorure de césium (^{131}Cs) pour le myocarde.

I. L'EXPLORATION CEREBRALE.

1. Méthode.

Le bilan isotopique que nous avons réalisé se déroule avec chaque traceur en deux phases :

- la première phase, précoce, permet une étude de la circulation cérébrale. Elle comporte une injection intraveineuse rapide de 15 à 16 mCi de traceur et la prise de vues séquentielles en incidence frontale toutes les deux ou trois secondes. La caméra à scintillations est une pho-gamma III (Nuclear Chicago) équipée d'un collimateur "haute résolution" de 15 000 trous. Les données numérisées sont stockées sur bande magnétique en vue d'un traitement à l'aide d'un ensemble comprenant un analyseur 4096 canaux et un calculateur Multi 8 de

12 K-octets de mémoire. Les courbes de la radioactivité en fonction du temps sont tracées, d'une manière générale, au niveau des carotides internes extracraniennes et des hémisphères cérébraux. En outre, certains secteurs d'intérêt particulier peuvent être analysés : il peut s'agir du trajet des artères sylviennes et cérébrales antérieures, de la convexité, de certaines zones lésionnelles et périlesionnelles et de leurs symétriques dans l'hémisphère controlatéral. Des vues statiques précoces, réalisées à partir de la cinquième minute en incidences frontales et de profil, représentent une intégration des informations pendant 4 à 5 minutes.

- la seconde phase, tardive, commence 1 h 30 à 2 heures après l'injection. Elle comporte essentiellement la prise de vues statiques. Parfois un enregistrement d'informations numérisées est associé afin de comparer quantitativement les données recueillies pendant les phases précoce et tardive.

2. Résultats.

Au total, 73 malades ont subi une exploration cérébrale à l'aide du pyrophosphate stannotechnétié. Sur ce nombre, nous n'avons retenu que 56 dossiers, éliminant de notre étude 7 cas d'atteinte de l'extrémité céphalique sans lésion du tissu nerveux et 10 cas de lésions cérébrales, soit diffuses, soit focales et de diagnostic incertain. La moyenne d'âge des 56 malades retenus est 61 ans, mais les fluctuations autour de cette moyenne sont relativement importantes. De plus, les deux sexes sont inégalement représentés (35 hommes pour 21 femmes).

L'examen a été fait successivement avec PP-Sn-Tc et le pertechnétate chez 54 malades, 2 malades n'ayant reçu que PP-Sn-Tc. L'étude de la phase circulatoire avec au moins un des deux produits radiopharmaceutiques a été réalisée 55 fois, mais les vues

séquentielles n'ont été prises dans la même incidence avec les deux traceurs que dans 33 cas.

Nous avons adopté pour cette étude la classification suivante (tableau I) :

1 - les lésions ischémiques avec déficit neurologique persistant plus de 24 heures (27 cas). Chez 25 malades le trouble s'est installé brutalement ce qui permet de distinguer les cas où l'examen a été fait dans les trois premières semaines et ceux vus plus tardivement. Les lésions siègent presque toujours dans le territoire des artères cérébrales moyennes, un seul malade ayant présenté une atteinte occipitale.

2 - les lésions expansives (29 cas). Ce groupe, beaucoup plus hétérogène que le précédent, couvre un assez large éventail des lésions focalisées du tissu nerveux. Mis à part un cas d'hémangioblastome cérébelleux, les lésions intéressent toujours la loge cérébrale. En raison de la forte affinité du pyrophosphate pour les sels phosphocalciques, nous avons isolé le cas où la lésion s'accompagnait soit d'un remaniement des os du crâne (8 méningiomes et 1 hématome extradural chronique), soit de calcifications intracrâniennes radiologiquement visibles (2 gliomes).

Sur les 27 malades porteurs de lésions ischémiques, 26 ont été examinés comparativement avec le pertechnétate. Deux dossiers n'ont pu être retenus pour la comparaison des deux produits radiopharmaceutiques, les délais d'examen après l'accident initial étant trop différents. Dans deux cas l'examen isotopique a été dans les limites de la normale avec les deux traceurs.

Les 22 dossiers restants concernent 13 foyers hyperactifs examinés au pyrophosphate

Classe \ Examen	nombre total	PERTECHNETATE			PYROPHOSPHATE		COMPARAISON	
		+ foyer	normal	non fait	+ foyer	normal	PP>TcO_4	impossible
LESIONS ISCHEMIQUES	27							
Pyrophosphate :								
- avant 22e jour	15	14	1	-	13	2	10	1
- après 22e jour	10	9	0	1	9	1	2	1
- progressif	2	1	1	-	1	1	0	-
LESIONS EXPANSIVES	29							
Gliomes	9	9	0	-	7	2	1	-
- + calcifications	2	2	0	-	2	0	1	-
Méningiomes	9	9	0	-	9	0	0	-
- + ostéoblastose	8	8	0	-	8	0	8	-
Métastases	3	3	0	-	3	0	0	-
Hémangioblastome	1	1	0	-	1	0	0	-
Anévrysme artériel	1	-	-	1	0	1	-	1
Hématomes	5							
- intracérébraux	4	4	0	-	2	2	0	-
- extradural chron.	1	1	0	-	1	0	1	-
Abcès	1	1	0	-	1	0	0	-

TABLEAU I : CLASSIFICATION DES DOSSIERS ET ANALYSE COMPARATIVE DES VUES STATIQUES TARDIVES

pendant les trois premières semaines d'évolution. Sur ces 13 cas, 10 ont montré une fixation du pyrophosphate plus intense que celle du pertechnétate (75 p.cent) suggérant, en plus d'une diffusion passive du traceur, un mécanisme actif de concentration (Figure 9). Il apparaît clairement que les foyers sont, avec le pyrophosphate, beaucoup plus hétérogènes. En effet, certaines zones concentrent intensément ce traceur alors que le reste du foyer est beaucoup moins marqué. Des images pommelées ou parfois ramifiées sont ainsi fréquemment observées.

Neuf cas examinés après la troisième semaine d'évolution présentent un foyer hyperactif avec les deux traceurs ; deux tiers de ces malades ont été vus à la quatrième semaine, et c'est dans ce dernier groupe que l'on a observé deux cas de fixations plus importantes avec le pyrophosphate qu'avec le pertechnétate. Dans tous les autres cas les foyers de diffusion des deux traceurs étaient soit comparables, soit plus marqués avec le pertechnétate.

L'analyse des résultats obtenus dans les cas de lésions expansives montre que leurs foyers de diffusion sont mis en évidence avec les deux traceurs. Cependant, les foyers de diffusion sont moins accentués avec le pyrophosphate qu'avec le pertechnétate. Lorsque la lésion s'accompagne d'une ostéoblastose réactionnelle des os du crâne, cette dernière concentre fortement le pyrophosphate. Ainsi, dans les 8 cas de méningiomes qui s'accompagnaient d'un envahissement osseux, le foyer mis en évidence par le pyrophosphate est très différent du foyer de diffusion du pertechnétate : alors que le pertechnétate réalise un foyer dense, homogène, de contours arrondis, le pyrophosphate ne se concentre fortement que dans la partie osseuse du méningiome, sa fixation intracrânienne étant beaucoup plus faible. De même, dans un cas de gliome calcifié, la fixation du

pyrophosphate au niveau des calcifications a été importante ; cependant nous n'avons pu confirmer ce résultat dans un deuxième cas de gliome calcifié, ce qui suggère une évolutivité différente des lésions. En effet, la fixation du pyrophosphate sur les dépôts calcifiés suppose que ces derniers soient accessibles depuis les capillaires sanguins, donc que les calcifications soient encore métaboliquement actives.

L'étude comparative des phases circulatoires du pertechnétate et du pyrophosphate a été possible dans 19 cas de lésions ischémiques, 7 cas de méningiomes et 7 cas de lésions expansives d'étiologies variées.

Dans les lésions ischémiques la première circulation est comparable avec les deux traceurs. On retrouve donc avec le pyrophosphate les modifications déjà décrites pour le pertechnétate : le transit de l'embol radioactif est ralenti de façon bilatérale, mais surtout du côté lésé. Lorsqu'il existe une sténose serrée ou une thrombose d'un gros tronc artériel l'arrivée de l'embol est retardée de 1 ou 2 secondes du côté pathologique. Dans la majorité des cas on observe du côté lésé une hypoactivité initiale suivie d'une hyperactivité à la fin de la première circulation. Cependant, dans 3 cas (15 p.cent) nous avons observé une hyperactivité précoce du côté lésé. Celle-ci nous paraît traduire l'existence d'un foyer hyperhémique qui diminue apparemment l'activité de l'hémisphère contro-latéral.

De même, dans les lésions expansives, les aspects de la première circulation sont comparables avec les deux produits radiopharmaceutiques. Toutefois, le pyrophosphate nous a semblé rester plus longuement intravasculaire que le pertechnétate. En effet, dans les cas de tumeurs kystiques, alors que le foyer devient rapidement diffus avec le pertechnétate, le pyrophosphate respecte, sur les vues statiques précoces, la zone kystique.

Signalons enfin un cas de méningiome pour lequel l'ostéoblastose réactionnelle s'est manifestée très tôt, donnant une hyperactivité importante sur les vues statiques précoces.

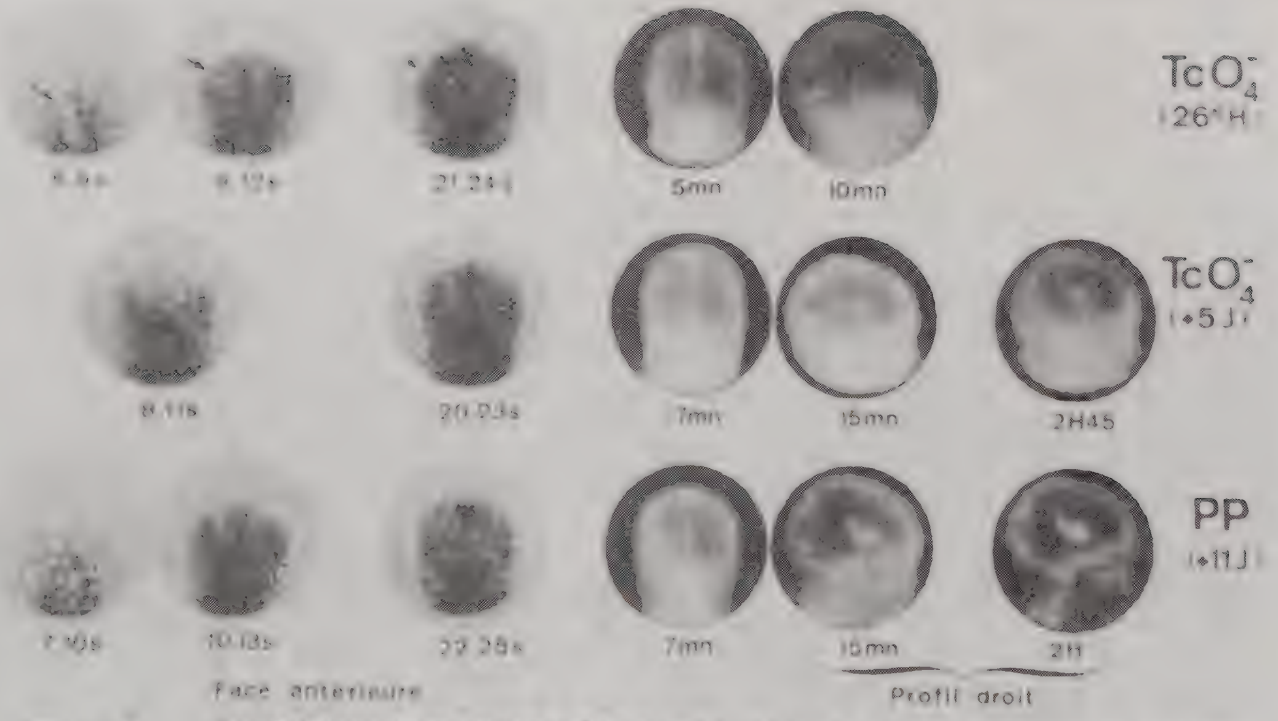
3. Exemples.

Trois cas serviront d'exemples pour illustrer quelques-unes des notions exposées ci-dessus.

Le premier cas concerne une femme de 56 ans (Figure 9), atteinte d'un syndrome angineux, qui a présenté une hémiplégie gauche dans les heures qui ont suivi une coronarographie.

Un premier bilan pratiqué à la vingt sixième heure avec le pertechnétate révèle un arrêt de l'embol radioactif au niveau de la bifurcation carotidienne droite. A l'étage cérébral, l'hémisphère droit, d'abord hypoactif au niveau de la convexité, devient hyperactif à la fin du premier transit, ce qui témoigne d'un retard associé à un important ralentissement circulatoire. Les vues statiques précoces sont dans les limites de la normale mais, la mise en route immédiate du traitement par l'urokinase et les vasodilatateurs, n'a pas permis de pratiquer l'examen tardif. Le diagnostic d'oblitération de la carotide interne droite est confirmé par effet Doppler,technique qui met également en évidence des turbulences au niveau de la bifurcation carotidienne gauche témoignant d'une oblitération partielle (ou d'une sténose serrée).

La malade est revue 4 jours plus tard. Les vues séquentielles, après injection de pertechnétate, sont devenues symétriques aussi bien à l'étage cervical qu'au niveau cérébral. Des turbulences sont perçues par effet Doppler au niveau des deux carotides, confirmant la reperméabilisation de la carotide interne droite. Un foyer radioactif de diffusion sylvien droit est alors mis en évidence.



RAMOLLISSEMENT SYLVIEN DROIT (THROMBOSE C. I. D. + REPERMEABILISATION)

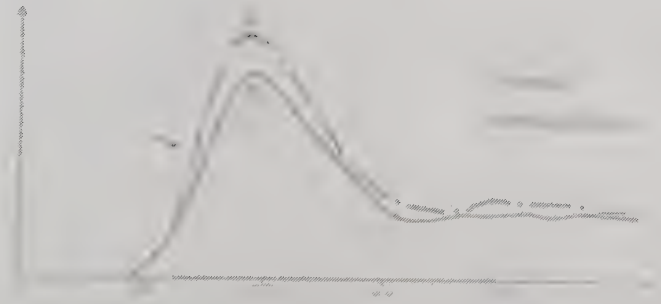
L'examen échographique montre que les structures médianes sont demeurées en place, éliminant un processus oedémateux ou hémorragique important.

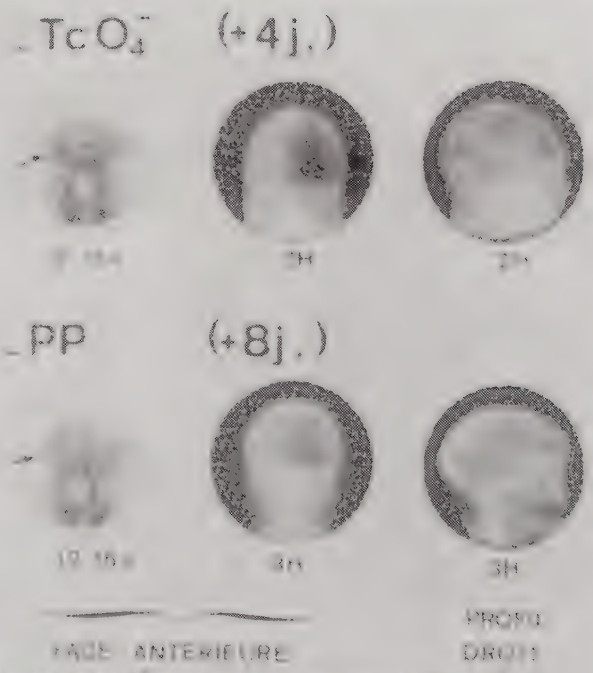
L'examen à l'aide de pyrophosphate marqué est pratiqué au onzième jour d'évolution. Les vues séquentielles sont comparables à celles de l'examen précédent. Par contre, il apparaît dès les vues statiques précoces un intense foyer hyperactif sylvien droit. Remarquons cependant qu'il s'agit du seul cas de foyer ischémique pour lequel on a observé une accumulation rapide du pyrophosphate. Dans tous les autres cas, les images précoces ont, en effet, été comparables avec les deux traceurs.

Dans cette observation, il est intéressant de souligner que le territoire lésé a été reperméabilisé après une ischémie totale de plusieurs heures. L'étude de la phase circulatoire montre que cette reperméabilisation rétablit un transit hémisphérique normal. Néanmoins, l'ischémie a provoqué des troubles importants dans la régulation des échanges ioniques comme le prouve l'intense concentration du pyrophosphate. Cependant ces perturbations ioniques ne semblent pas s'accompagner d'oedème lésionnel. L'absence de récupération motrice, deux mois après l'accident, est en faveur de l'irréversibilité des lésions neuronales.

Le deuxième cas (Figure 10) illustre la possibilité de lésions ischémiques récentes dans lesquelles la fixation du pyrophosphate est plus faible que celle du pertechnétate.

Il s'agit d'une femme de 75 ans, hypertendue de longue date, ayant présenté 7 ans auparavant un épisode d'arythmie complète, traité par choc électrique. Après une période de quelques semaines marquées par des épisodes rapidement régressifs de pertes de connaissance, de confusion mentale et de déficits moteurs gauches partiels, une hémiplégie





RAMOLLISSEMENT SYLVIEN DROIT (FOYER HYPERHEMIQUE)

gauche s'installe brutalement. Elle est accompagnée d'une hémianopsie latérale homonyme gauche et de troubles confusionnels. Seules ces derniers régresseront après quelques jours d'évolution ; un mois après l'accident neurologique la motricité volontaire est encore très faible du côté gauche.

Un premier bilan isotopique, avec le pertechnétate, est réalisé au quatrième jour d'évolution. Il met en évidence un important foyer sylvien droit dont la phase circulatoire comporte une composante hyperhémique. L'échographie montre un déplacement des structures médianes de 3 mm vers la gauche, ce qui est compatible avec la présence d'un foyer réactionnel hyperhémique. Par ailleurs, il ne semble pas exister d'atteinte des gros troncs artériels.

Un deuxième examen, avec le pyrophosphate, est pratiqué au huitième jour d'évolution, L'étude dynamique est comparable à celle de l'examen précédent et montre une zone hyperhémique dans l'hémisphère droit. Cependant, avec le pyrophosphate, le foyer de diffusion est moins bien visualisé qu'avec le pertechnétate. Son aspect est nettement ramifié, des branches se dirigeant d'une part vers la région coronale et, d'autre part, vers la région pariéto-occipitale.

Un examen isotopique de contrôle a été effectué 1 mois après l'accident neurologique. Réalisé avec le pyrophosphate marqué, ce bilan met en évidence un retard et un ralentissement circulatoires dans l'hémisphère droit. Le foyer hyperhémique a disparu. Les structures médianes sont maintenant en place, alors que le foyer de diffusion est comparable à celui objectivé au huitième jour.

Bien que l'examen ait suivi de peu le début clinique, la fixation du pyrophosphate dans ce cas de lésion ischémique est donc relativement faible. L'étude circulatoire montre que l'hyperhémie observée durant la première semaine d'évolution est

le trouble hémodynamique le plus important. Cette hyperhémie représente une augmentation régionale du lit vasculaire cérébral, en l'absence de toute malformation vasculaire. La faible participation du pyrophosphate circulant aux échanges ioniques indique une mauvaise adaptation de la vascularisation lésionnelle aux besoins métaboliques tissulaires. Dans ce cas, l'hyperhémie paraît résulter d'une ouverture de shunts artérioveineux plutôt que d'une dilatation artériolo-capillaire. Elle entraîne un phénomène d'hémodétournement aux dépens du parenchyme ischémié.

Nous avons observé deux autres cas d'hyperhémie cérébrale réactionnelle paraissant s'opposer au précédent. En effet, les vues tardives mettent en évidence une fixation du pyrophosphate plus intense que celle du pertechnétate. Dans ces deux cas, les courbes de radioactivité en fonction du temps montrent un maximum d'hyperactivité dès le temps artériel, aspect plutôt en faveur d'une dilatation artériolo-capillaire.

Le troisième cas est celui d'un homme de 76 ans chez lequel est apparu de façon rapidement progressive une confusion mentale avec désorientation temporo-spatiale majeure ainsi qu'une paralysie faciale droite. L'examen physique est difficile, le malade n'obéissant pas du tout aux ordres. Cependant, la marche est possible et l'étude de la motricité segmentaire ne révèle qu'un très discret déficit du membre supérieur droit. L'artériographie carotidienne montre une très volumineuse lésion expansive frontale gauche, avec présence de vaisseaux pathologiques. L'intervention chirurgicale confirme la présence d'une tumeur frontale gauche, dont le centre est kystique mais hémorragique. L'examen histologique montre qu'il s'agit d'un astrocytome de grade III de la classification de Kernohan ; il confirme la présence de nombreux vaisseaux ainsi que de larges foyers nécrotico-hémorragiques.

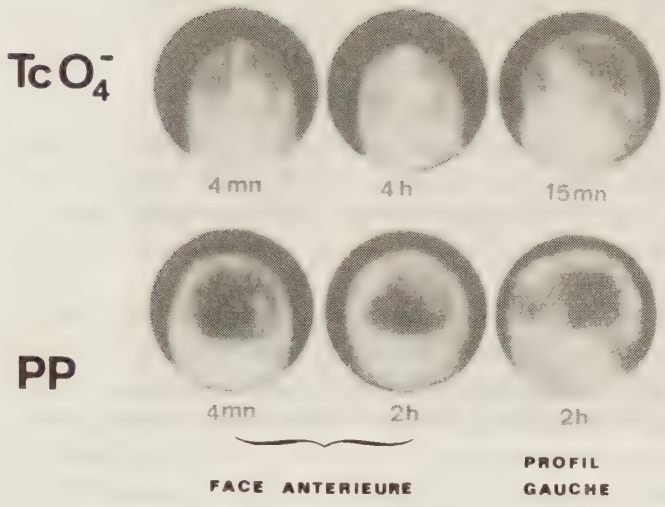


Figure 11: ASTROCYTOME FRONTAL GAUCHE.

Le bilan isotopique a été pratiqué en préopératoire (Figure 11) d'une part avec le pertechnétate d'autre part avec le pyrophosphate. Le foyer de diffusion est nettement moins visible avec le pyrophosphate ; cependant, avec ce traceur, la partie kystique et les territoires fortement vascularisés sont mieux individualisés, ce qui indique que le pyrophosphate reste plus longuement intravasculaire.

II. L' EXPLORATION MYOCARDIQUE.

1. Méthode.

La majorité des malades examinés a subi non seulement une étude de la fixation du pyrophosphate dans l'aire myocardique mais également une exploration scintigraphique du myocarde sain et des cavités cardiaques.

Un premier bilan myocardique est effectué à l'aide de chlorure de césium (^{131}Cs). La scintigraphie prend place 1 h 30 à 2 heures après l'injection intraveineuse de 25 µCi/kg du traceur. Deux incidences sont enregistrées, l'une en face antérieure, l'autre en oblique antérieure gauche.

Dans un deuxième temps, le bilan par le pyrophosphate stannotechnétié (^{99m}Tc) est réalisé après l'injection intraveineuse de 12 à 15 mCi de ce produit radiopharmaceutique. Le délai de l'examen est généralement de 1 h 30 ; il a dépassé six fois 2 h 30. La scintigraphie est faite en vue antérieure. Lorsque cela est possible, le malade restant dans la même position, une scintigraphie cavitaire est réalisée aussitôt, 5 minutes après injection de 4 mCi de ^{113m}In-transferrine. Cet examen est complété par des scintigrammes en incidence oblique (oblique antérieure gauche et oblique antérieure droite).

2. Résultats.

Par cette technique nous avons examiné 21 malades, d'un âge moyen de 62 ans. L'histoire clinique, les dosages enzymatiques ou l'électrocardiogramme étaient évocateurs de nécrose myocardique chez 15 de ces malades, parmi lesquels 12 cas de nécroses récentes (c'est-à-dire vues pendant le premier mois d'évolution).

Dans cette étude nous avons remarqué le rôle important joué par la radioactivité circulante, présente notamment dans les cavités cardiaques. Pour cette raison, nous avons réparti nos observations en deux classes :

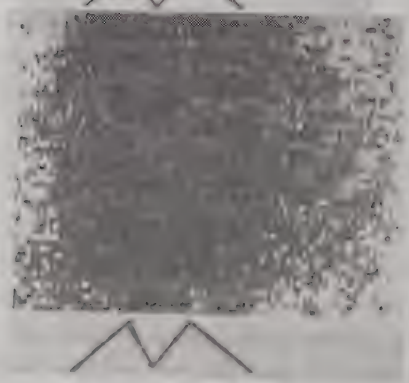
- celles avec cavités cardiaques de volume normal (7 cas)
- celles avec cavités cardiaques dilatées (14 cas).

Sur les 14 malades porteurs d'une dilatation cavitaire, 12 ont présenté une hyperactivité parasternale gauche, superposable dans tous les cas aux cavités cardiaques. Pour illustrer le rôle de la radioactivité circulante nous présentons le cas (Figure 12) d'une femme de 67 ans porteuse d'une cardiomégalie globale importante, sans signe de nécrose myocardique. On constate que les contours de l'image obtenue avec le pyrophosphate sont ceux de la scintigraphie cavitaire.

Une étude quantitative a pu également être faite chez une malade porteuse d'un infarctus antéro-septal ancien accompagné d'une dilatation de la cavité ventriculaire gauche. L'enregistrement des données numérisées nous a permis d'évaluer quantitativement la radioactivité présente d'une part dans les cavités gauches 2 minutes après l'injection et d'autre part dans le foyer hyperactif 2 heures plus tard. Chaque fois un prélèvement sanguin, effectué simultanément, permet de mesurer l'activité de 1 ml de sang total et de rapporter à cette activité circulante, les données numérisées de la caméra à scintillations. On constate que le rapport entre l'activité détectée au niveau des cavités puis du foyer et l'activité sanguine reste pratiquement constant. Ainsi, bien qu'il apparaisse une image en foyer dans la région parasternale gauche, elle ne concentre pas le traceur.

Cliche thoracique

Cavités cardiaques
(^{113m}In)



Pyrophosphate
(^{99m}Tc)

2h apres injection

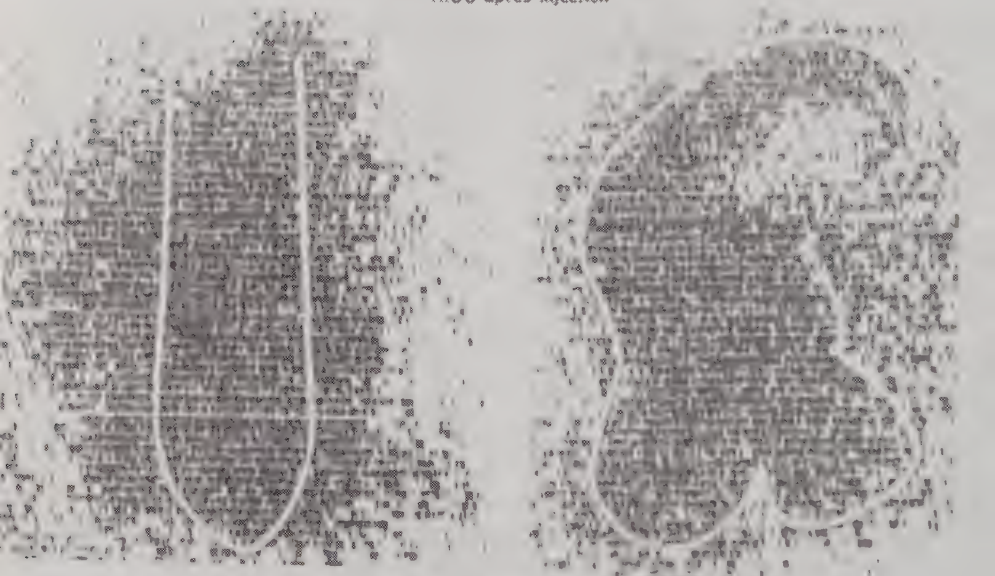
Figure 14 : CARDIOMEGALIE GLOBALE

Nous n'avons pu étudier que 7 malades sans dilatation cavitaire ; 3 d'entre eux seulement présentaient un tableau de nécrose myocardique récente. Chez les 4 sujets avec un myocarde considéré comme normal, le balayage thoracique s'est avéré dans les limites de la normale. Dans ces cas, examinés au minimum 1 h 30 après l'injection, la fixation du pyrophosphate par le sternum, les côtes et surtout les articulations chondrocostales est importante, mais peut être artificiellement réduite en ne faisant pas apparaître sur l'image scintigraphique les territoires dont l'activité n'atteint pas un seuil réglable en fonction du maximum de radioactivité.

Dans les 3 cas de nécrose myocardique récente, sans dilatation cavitaire, nous avons constaté la présence d'une part d'un territoire myocardique lacunaire (1 cas) ou hypofixant (2 cas) avec le césium 131, et, d'autre part, d'un foyer hyperactif se projetant dans l'aire myocardique avec le pyrophosphate. Le territoire nécrotique objectivé par le césium 131 est, dans tous les cas, superposable au foyer d'hyperactivité du pyrophosphate. Les trois malades ont été examinés respectivement 2, 4 et 21 jours après la survenue de la lésion. Cependant, la fixation du pyrophosphate a été la plus intense au quatrième jour d'évolution et nous illustrons ce cas par la figure 13. Ainsi, sur le plan des délais d'examen par rapport au début clinique des troubles nos résultats sont en accord avec ceux d'autres auteurs (Parkey, 1974).

Pyrophosphate (^{99m}Tc)

1h30 après injection



Cavités Cardiaques (^{113m}In)

Myocarde (^{131}Cs)

F.A. **O.A.G.**

FIGURE 13 : INFARCTUS ANTERO-SEPTAL (+4j)

III. CONCLUSIONS.

Pour ce qui concerne le tissu nerveux, la concentration du pyrophosphate stannotechnétié dans les lésions ischémiques récentes est importante et on obtient une fixation de ce produit radiopharmaceutique plus intense que celle du pertechnétate dans 75 p.cent des cas. Cependant, au-delà d'un délai de trois semaines d'évolution clinique, les fixations des deux traceurs deviennent comparables. De même, dans les lésions expansives, il n'a pas été mis en évidence de concentration du pyrophosphate plus importante que celle du pertechnétate, sauf lorsqu'il existe une ostéoblastose réactionnelle ou des dépôts macroscopiques de sels phosphocalciques.

Le phénomène de diffusion passive existe pour le pyrophosphate stannotechnétié, mais paraît plus lent pour ce traceur que pour le pertechnétate. Ainsi, le contraste entre zones richement vascularisées et zones avasculaires se trouve augmenté. A côté de phénomènes passifs de diffusion, un processus actif de concentration est suggéré pour expliquer l'intensité des images obtenues dans les lésions ischémiques. Il semble cependant nécessaire que la vascularisation soit suffisante, pour permettre l'accumulation du pyrophosphate stannotechnétié par le parenchyme cérébral irréversiblement lésé au cours de l'anoxie. Dans ces conditions, seules les zones relativement bien perfusées au niveau d'un foyer de ramollissement peuvent concentrer fortement le traceur.

L'exploration des nécroses myocardiques récentes par le pyrophosphate stannotechnétié rencontre deux inconvénients majeurs : d'une part la fixation du produit dans le grill costal donne des superpositions difficiles à éliminer ; d'autre part,

la radioactivité circulante est à l'origine de fausses images dans les cas de dilatations cavitaires, même lorsque l'examen est pratiqué tardivement. Ceci restreint considérablement les possibilités de ce produit radiopharmaceutique pour cette exploration. Cependant avec une scintigraphie cavitaire de contrôle et, surtout, en pratiquant l'examen à l'aide d'une gamma-caméra associée à un ensemble de traitement de l'information, il est possible de mettre en évidence des infarctus myocardiques récents, notamment au cours de la première semaine d'évolution. Ainsi, la répétition de l'examen au pyrophosphate, à plusieurs jours d'intervalle, pourrait permettre de suivre l'évolution des lésions , en intensité comme en étendue.

CONCLUSIONS

Produit du métabolisme intermédiaire, le pyrophosphate de l'organisme est très rapidement dégradé par les enzymes à activité pyrophosphatasique. Marqué extemporanément par le technétium 99m en présence d'étain stanneux, le pyrophosphate introduit par voie intraveineuse est beaucoup plus stable. Le complexe formé est éliminé de la circulation sanguine par excrétion rénale et par fixation sur le tissu osseux. Ce dernier processus, dont le mécanisme responsable paraît être la grande affinité du pyrophosphate pour les cristaux d'hydroxyapatite, est exploité en médecine nucléaire pour l'exploration du squelette.

Le pyrophosphate stannotechnétié se concentre également fortement dans certaines lésions des tissus mous, notamment les lésions cérébrales et myocardiques d'origine ischémique.

Sur le plan biologique, il existe un lien entre le métabolisme osseux et le métabolisme des tissus ischémiés ; en effet, le métabolisme des cellules du cartilage ossifiable comporte une phase anoxique au cours de laquelle s'accumulent les ions phosphates et calcium , d'abord dans les mitochondries, puis dans les espaces extracellulaires. Quel que soit le tissu étudié, l'anoxie cellulaire s'accompagne d'importantes modifications biochimiques, parmi lesquelles on observe précocément une consommation du glycogène cellulaire. Au niveau mitochondrial, la phosphorylation oxydative est interrompue. L'accumulation dans la mitochondrie de lipides sous

forme de dépôts amorphes ainsi que de calcium et de phosphates sous forme de granules denses sont des altérations ultrastructurales caractéristiques des lésions anoxiques irréversibles. Il est suggéré que le pyrophosphate stannotechnétié puisse accompagner les ions phosphocalciques et s'accumuler ainsi dans les cellules lésées.

Au niveau cérébral, l'intérêt clinique du pyrophosphate est de contribuer au diagnostic de nature des foyers lésionnels. Nous avons en effet observé, dans 75 p.cent des cas de lésions ischémiques vus pendant les trois premières semaines d'évolution, une fixation dans la lésion du pyrophosphate stannotechnétié plus intense que celle du pertechnétate, suggérant ainsi un processus actif de concentration. Il faut cependant remarquer que l'intensité de ce processus n'est ni toujours comparable d'un malade à l'autre ni homogène au sein d'un même foyer de ramollissement, laissant supposer des mécanismes physiopathologiques différents. Au contraire, dans tous les cas de lésions expansives, sans ostéoblastose réactionnelle ni calcifications intralésionnelles, la fixation du pyrophosphate stannotechnétié est soit comparable soit inférieure à celle du pertechnétate.

Au niveau myocardique, nous avons mis en évidence la participation du pyrophosphate stannotechnétié circulant à la constitution du foyer hyperactif observé en regard des cavités cardiaques. Ceci est particulièrement néfaste dans les cas de dilatations cavitaires pour lesquels on observe presque toujours un foyer hyperactif suspect. Il ne nous paraît pas possible d'affirmer dans ces cas l'origine, ou bien cavitaire, ou bien myocardique, de la radioactivité. Par contre, lorsque la scintigraphie cavitaire de contrôle reste dans les limites de la normale, l'interprétation de la scintigraphie au pyrophosphate stannotechnétié est possible. Elle est positive dans les nécroses myocardiques récentes

et surtout pendant la première semaine d'évolution.

Finalement, le pyrophosphate stannotechnétié ne doit plus être considéré comme un traceur spécifique du tissu osseux. Il s'accumule partout où existe un mécanisme de concentration, à partir du compartiment vasculaire, des phosphates et du calcium. Cette propriété paraît particulièrement importante et intéressante dans les cas de lésions ischémiques, notamment cérébrales, permettant de ce fait le diagnostic de ramollissements avec une faible marge d'erreur.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ACKERHALT R.E., BLAU M., BAKSHI S., SONDEL J.A.
A comparative study of three ^{99m}Tc-labeled phosphorous compounds and ^{18}F-fluoride for skeletal imaging.
J. Nucl. Med., (1973), 14, 375.

ADISESHAN M.
Radiostrontium localization in normal lungs ? Occult aspergillosis versus "apparently normal" lungs.
J. Nucl. Med., (1973), 14, 722.

ALCOCK N.W., SHILS M.E.
Association of inorganic pyrophosphatase activity with normal calcification of rat costal cartilage in vivo.
Biochem. J., (1969), 112, 505.

ANGHILERI L.J., MILLER E.S.
Studies on the possibility of improving the selective localization of radiophosphorous in different tissues.
Strahlentherapie, (1970), 140, 671.

ANGHILERI L.J.
The effects of acid and alkaline phosphatase on sodium polyphosphates.
Enzyme, (1971), 12, 70.

ANGHILERI L.J., MILLER E.S.
The hydrolysis of sodium polyphosphates.
Z. Naturforsch., (1971), 26 b, 543.

ANGHILERI L.J.
The metabolic fate of polyphosphates incorporated into bone tissue.
Int. J. Clin. Pharmacol., (1971), 4, 373.

ANGHILERI L.J.
In vivo distribution and excretion of intravenously injected poplyphosphates.
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.), (1972), 22, 634.

ANGHILERI L.J., MILLER E.S.
A comparative study of the in vivo distribution of ^{32}P-polyphosphates and ^{32}P-orthophosphate.
Nuclear-Medizin, (1972), 9, 70.

ASCENZI A., BONUCCI E.
Etude comparée au microscope électronique des phases initiales de la calcification de l'os et du cartilage.
In "Phosphate et métabolisme phosphocalcique", (1970), Symposium International - Paris, Sandoz Ed., p. 63.

AZZI A., AZZONE G.F.
Swelling and shrinkage phenomena in liver mitochondria.
IV - Reversible swelling changes linked to transport of monovalent cations stimulated by valinomycin.
Biochim. Biophys. Acta, (1966), 113, 445.

AZZI A., CHANCE B.
The "energized state" of mitochondria : lifetime and ATP equivalence.
Biochim. Biophys. Acta, (1969), 189, 141.

BAKAY L., HUERTER T.F., BALLANTINE H.T., SOSA D.
Ultrasonically produced changes in the blood-brain barrier.
Arch. Neurol. Psychiat., (1956), 76, 457.

BAKAY L.
Relationship between cerebral vascularity and ^{32}P uptake.
Arch. Neurol., (1959), 1, 59.

BAKAY L., HAQUE I.U.
Morphological and chemical studies in cerebral edema.
I - Cold induced edema.
J. Neuropath. Exp. Neurol., (1964), 23, 393.

BAKAY L.
Morphological and chemical studies in cerebral edema : Triethyl Tin-induced edema.
J. Neurol. Sci., (1965), 2, 52.

BAKAY L.
Basic aspects of brain tumor localization by radioactive substances. A review of current concepts.
J. Neurosurg., (1967), 27, 239.

BAKAY L., LEE J.C.
The effect of acute hypoxia and hypercapnia on the ultrastructure of the central nervous system.
Brain, (1968), 91, 697.

BAKAY L.
Basic aspects of the accumulation of substances in brain tumors.
In "Brain tumor scanning with radioisotopes"., (1969), Bakay L., Thomas C.C. Ed. Springfield Ill., p. 6.

BALDY-MOULINIER M., HUMEAU C., SENTEIN P., PASSOUANT P.
Modifications ultrastructurales primitives du cortex cérébral au cours de différents types d'anoxie cérébrale expérimentale.
Comptes-rendus Soc. Biol. Montpellier, (1973),167, 1886.

BASSETT C.A., DONATH A., MACAGNO F., PREISIG P., FLEISCH H., FRANCIS M.D.
Diphosphonates in the treatment of myositis ossificans.
Lancet, (1969), 2, 845.

BECKER N.H.
The cytochemistry of anoxic and anoxic-ischemic encephalopathy in rats.
2 - Alterations in neuronal mitochondria identified by diphosphopyridine and triphosphopyridine diaphorases.
Am. J. Path., (1961), 38, 587.

BECKER N.H.
The cytochemistry of anoxic and anoxic-ischemic encephalopathy in rats.
3 - Alterations in the neuronal golgi apparatus identified by nucleoside diphosphatase activity.
Am. J. Path., (1962), 40, 243.

BLOOM S., CANCILLA P.A.
Myocytolysis and mitochondrial calcification in rat myocardium after low doses of isoproterenol.
Am. J. Path., (1969), 54, 373.

BOK B., PEREZ P., PANNECIEPE C., DI PAOLA R.
Bone scanning radiopharmaceuticals : a comparison of three products.
J. Nucl. Med., (1973), 380, (ABST.).

BONTE F.J., GRAHAM K.D., MOORE J.G., PARKEY P.W., CURRY G.C.
Preparation of ^{99m}Tc-Oleic acid complex for myocardial imaging.
J. Nucl. Med., (1973), 14, 381, (ABST.).

BONTE F.J., PARKEY P.W., GRAHAM K.D., MOORE J., STOKELY E.M.
A new method for radionuclide imaging of myocardial infarcts.
Radiology, (1974), 110, 473.

BONTE F.J., PARKEY P.W.
A new method for imaging myocardial infarcts.
J. Nucl. Med., (1974), 15, 479, (ABST.).

BONUCCI E.
The locus of initial calcification in cartilage and bone.
Clin. Orthop., (1971), 78, 108.

BORLE A.B.
Effets du phosphate sur les mouvements du calcium en cultures cellulaires.
In "Phosphate et métabolisme phosphocalcique"., (1970), Symposium International-Paris, Sandoz Ed., p. 29.

BOWEN B.M., GARNETT E.S.
Analysis of the relationship between ^{99m}Tc-Sn-polyphosphate and ^{99m}Tc-Sn-pyrophosphate.
J. Nucl. Med., (1974), 15, 652.

BRIERLEY G.P., MUPEP E., BACHMANN E.
Studies on ion transport.
III - The accumulation of calcium and inorganic phosphate by heart mitochondria.
Arch. Biochem. Biophysics, (1964), 105, 89.

BRIGHTON C.T., HUNT R.M.
Mitochondrial calcium and its role in calcification.
Clin. Orthop., (1974), 100, 406.

BROCHIER M., PLANIOL T., GARNIER G., ARCHAMBAUD D., RAYNAUD R.
La scintigraphie du myocarde et de ses lésions.
Arch. Mal. du coeur, (1971), 64, 921.

BROWER A.C., TEATES C.D.
Positive ^{99m}Tc-polyphosphate scan in case of metastatic osteogenic sarcoma and hypertrophic pulmonary osteoarthropathy.
J. Nucl. Med., (1974), 15, 53.

BROWN A.W., BRIERLEY J.B.
The nature, distribution and earliest stages of anoxic-ischaemic nerve cell damage in the rat brain as defined by the optical microscope.
Brit. J. Exp. Path. (1968), 49, 87.

BROWN A.W., BRIERLEY J.B.
Anoxic-ischaemic cell change in rat brain. Light microscopic and fine structural observations.
J. Neurol. Sci., (1972), 16, 59.

BRUNEL C.
Sur la purification et les propriétés de la phosphatase alcaline du cerveau.
Thèse de Sciences Physiques - Université des Sciences et Techniques du Languedoc., (1972).

BULL U., BALSER D., BOHNER-SCHOBERTH I., FREY K.W.
Kinetics of ^{99m}Tc-pyrophosphate in comparison with ^{85}Sr in acute and chronic damage of soft tissue and bone.
Communication à la XIIe réunion annuelle de la Société de Médecine Nucléaire Allemande, 11 - 14 septembre 1974.

CABANELA M.E., JOWSEY J.
The effect of diphosphonate on experimental osteoporosis.
Calc. Tiss. Res., (1971), 8, 114.

CABANELA M.E., JOWSEY J.
Effect of ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate on bone turnover in adult dogs.
Clin. Orthop. (1974), 100, 364.

CAHILL G.F., HOCH F.L.
Metabolisme intermédiaire des protides, des lipides et des glucides.
In "Principes de Médecine Interne", (1972), HARRISON T.P., FLAMMARION Ed., p. 379.

CARR E.A. Jr, BEIERWALTES W.H., WEGST A.V., BARTLETT J.D. Jr.
Myocardial scanning with rubidium 86.
J. Nucl. Med., (1962), 3, 76.

CARR E.A. Jr, BEIERWALTES W.H., PATNO M.E., BARTLETT J.D., WEGST A.V.
The detection of experimental myocardial infarcts by photoscanning.
Am. Heart J., (1962), 64, 650.

CARR E.A. Jr, CAFRUNY E.J., BARTLETT J.D.
Evaluation of Hg^{203} Chlormerodrin in the demonstration of human myocardial infarcts by scanning.
Univ. Michigan Medical Bulletin, (1968), 29, 27.

CARR E.A. Jr, GLEASON C., SHAW J., KRONTZ B.
The direct diagnosis of myocardial infarcts by photoscanning after administration of caesium 131.
Am. Heart J., (1964), 68, 627.

CARR E.A. Jr, CARROLL M., Di GIULIO W.
Development of radioiodinated toluidine blue for myocardial imaging.
Clin. Pharmacol. and Therap., (1972), 13, n° 1.

CARTIER P., PICARD J.
La minéralisation du cartilage ossifiable.
I - La minéralisation du cartilage in vitro.
Bull. Soc. Chim. Biol., (1955), 37, 485.

CARTIER P., PICARD J.
La minéralisation du cartilage ossifiable.
II - Le système ATPasique du cartilage.
Bull. Soc. Chim. Biol., (1955), 37, 661.

CARTIER P., PICARD J.
La minéralisation du cartilage ossifiable.
III - Le mécanisme de la réaction ATPasique du cartilage.
Bull. Soc. Chim. Biol., (1955), 37, 1159.

CARTIER P., PICARD J.
La minéralisation du cartilage ossifiable.
IV - La signification de la réaction ATPasique.
Bull. Soc. Chim. Biol., (1955), 37, 1169.

CAPTIER P.
Les constituants minéraux de tissus calcifiés.
V - Separation et identification de pyrophosphates dans le tissu osseux.
Bull. Soc. Chim. Biol., (1957), 39, 169.

CASTPONOVO F.P. Jr, CALLAHAN P.J.
New bone scanning agent : ^{99m}Tc-labeled 1-hydroxyethylidène-1, 1-disodium phosphonate.
J. Nucl. Med., (1972), 13, 823.

CASTRONOVO F.P. Jr.
Pharmaceutical toxity as a function of biodegradability.
J. Nucl. Med., (1973), 14, 719.

CASTRONOVO F.P. Jr, CALLAHAN P.J.
"Cardiac changes with ^{99m}Tc-tin-phosphate radiopharmaceuticals".
The author's reply.
J. Nucl. Med., (1973), 14, 774.

CERLETTI P., IPATA P.L., TANCREDI G.
Pyrophosphatases of bone.
Experientia, (1958), 14, 440.

CHARBON G.A., PIEPER E.E.
On extra-osseous actions of parathyroid hormone and calcitonin.
Clin. Orthop., (1971), 78, 14.

CHAUDHURI T.K., CHAUDHURI T.K., CHRISTIE J.H.
Uptake of radiostrontium in lungs and other extraosseous tissues.
J. Nucl. Med., (1972), 13, 860.

CHAUDHURI T.K.
Radiostrontium localization in normal lungs ?
Occult aspergillosis versus "apparently normal" lungs.
The author's reply.
J. Nucl. Med. (1973), 14, 723.

CHAUDHURI T.K., CHAUDHURI T.K., CHRISTIE J.H.
Tumor uptake of ^{99m}Tc-polyphosphate : its similarity with ^{87m}Sr-citrate and dissimilarity with ^{67}Ga-citrate.
J. Nucl. Med., (1974), 15, 458.

CHIEWITZ O., HEVESY G.
Radioactive indicators in the study of phosphorus metabolism in rats.
Nature, (1935), 136, 754.

COHEN Y., PEREZ P., HENRY R., BARDY A., PANNECIERE C.
Utilisation du pyrophosphate de sodium marqué par le technétium 99m dans la scintigraphie du squelette.
C.R. Acad. Sc. Paris, (1972), 275, série D-1719.

COHEN S.P.
Phosphatases
In "Handbook of Neurochemistry", vol. 3, p. 87, Ed. by E. LAJTHA, Plenum Press, (1970).

CRAM R.L., BARMADA P., GEHO W.B., RAY P.D.
Diphosphonate treatment of calcinosis universalis.
New England J. Med., (1971), 285, 1012.

D'AGOSTINO A.N.
An electron microscopic study of cardiac necrosis produced by 9α-fluorocortisol and sodium phosphate.
Am. J. Path., (1964), 45, 633.

D'AGOSTINO A.N., CHIGA M.
Mitochondrial mineralization in human myocardium.
Amer. J. Clin. Path., (1970), 53, 820.

DEWANJEE M.K., FLETCHER J.W., DAVIS M.A.
Chemical properties and biologic distribution of Technétium-Tin-Polyphosphates.
J. Nucl. Med., (1972), 13, 427, (ABST.).

DEWANJEE M.K., PRINCE E.W.
A new cellular necrosis model in tissue culture : cellular uptake of ^{99m}Tc-Tetracycline and the pertechnetate ion.
J. Nucl. Med., (1973), 13, 392, (ABST.).

DEWANJEE M.K., PRINCE E.W.
Cellular necrosis model in tissue culture : uptake of ^{99m}Tc-tetracycline and the pertechnetate ion.
J. Nucl. Med., (1974), 15, 577.

DILLMAN L.T.
Radionuclide decay schemes and nuclear parameters for use in radiation-dose estimation.
J. Nucl. Med., (1969), 10, (suppl. II), 5.

DODSON R.F., AOYAGI M., HARTMANN A., TAGASHIRA Y.
Acute cerebral infarction and hypotension : an ultrastructural study.
J. Neuropath. Exp. Neurol., (1974), 33, 400.

EANES ED., GILLESSEN I.N., POSNER A.S.
Intermediate states in the precipitation of hydroxyapatite.
Nature, (1965), 208, 365.

EANES E.D., TEPMINE J.D., POSNER A.S.
Amorphous calcium phosphate in skeletal tissues.
Clin. Orthop., (1967), 53, 223.

EATON R.H., MOSS D.W.
Inhibition of the orthophosphatase and pyrophosphatase activities of human alkaline-phosphatase preparations.
Biochem. J., (1967), 102, 917.

ECKELMAN W.C., REBA R.C., KUBOTA H., STEVENSON J.S.
^{99m}Tc-pyrophosphates for bone imaging.
J. Nucl. Med., (1974), 15, 279.

EVANS J.R., GUNTON R.N., BAKER R.G., BEANLANDS D.S., SPEARS J.C.
Use of radio-iodinated fatty acid for photoscans of the heart.
Circul. Res., (1965), 16, 1.

FELS I., KAPLAN E., GRECO J., VEATCH R.
Incorporation in vivo of P^{32} from condensed phosphates.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., (1959), 100, 53.

FERNLEY H.N., WALKER P.G.
Studies on alkaline phosphatase - inhibition by phosphate derivatives and the substrate specificity.
Biochem. J., (1967), 104, 1011.

FERNLEY H.N., BISAZ S.
Studies on alkaline phosphatase. Phosphorylation of calf-intestinal alkaline phosphatase by ^{32}P-labeled pyrophosphate.
Biochem. J., (1968), 107, 279.

FISCHER K.C., PENDERGRASS H.P., McKUSICK K.A., POTSAID M.S.
Increased brain scan specificity by the use of ^{99m}Tc-Diphosphonate.
J. Nucl. Med., (1974), 15, 490.

FLANAGAN B., NICHOLS G. Jr.
Metabolic studies of human bone in vitro.
I - Normal bone.
J. Clin. Invest., (1965), 44, 1788.

FLEISCH H., NEUMAN W.F.
Mechanisms of calcification : role of collagen, polyphosphates, and phosphatase.
Am. J. Physiol., (1961), 200, 1296.

FLEISCH H., BISAZ S.
Isolation from urine of pyrophosphate, a calcification inhibitor.
Am. J. Physiol., (1962), 203, 671.

FLEISCH H. BISAZ S.
Mechanism of calcification : inhibitory role of pyrophosphate.
Nature, (1962), 195, 911.

FLEISCH H., BISAZ S., CAPE A.
Effect of orthophosphate on urinary pyrophosphate excretion and the prevention of urolithiasis.
Lancet, (1964), 1, 1065.

FLEISCH H., SCHIBLER D., MAERKI J., FROSSARD J.
Inhibition of aortic calcification by means of pyrophosphate and polyphosphates.
Nature, (1965), 207, 1300.

FLEISCH H., STRAUMANN F., SCHENK P., BISAZ S., ALLGOWER M.
Effect of condensed phosphates on calcification of chick embryo femurs in tissue culture.
Am. J. Physiol., (1966), 211, 821.

FLEISCH H., MAERKI J., RUSSEL R.G.
Effect of pyrophosphate on dissolution of hydroxyapatite and its possible importance in calcium homeostasis.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., (1966), 122, 317.

FLEISCH H., RUSSELL R.G., STRAUMANN F.
Effect of pyrophosphate on hydroxyapatite and its implications in calcium homeostasis.
Nature, (1966), 212, 901.

FLEISCH H., RUSSELL R.G., FRANCIS M.D.
Diphosphonates inhibit hydroxyapatite dissolution in vitro and bone resorption in tissue culture and in vivo.
Science, (1969), 165, 1262.

FLEISCH H., RUSSELL R.G., SIMPSON B., MUHLBAUER R.C.
Prevention by a diphosphonate of immobilization "osteoporosis" in rats.
Nature, (1969), 223, 211.

FLEISCH H., RUSSELL R.G., BISAZ S., MUHLBAUER R.C.
The inhibitory effect of phosphonates on the formation of calcium phosphate crystals in vitro and on aortic and kidney calcification in vivo.
Europ. J. Clin. Invest., (1970), 1, 12.

FLEISCH H., RUSSELL R.G.
Orthophosphate, pyrophosphate and diphosphonates in calcium metabolism.
In "Phosphate et métabolisme phosphocalcique"., (1970), Symposium International Paris, Sandoz Ed., p. 57.

FLOYPAC R.
La gamma-angiocardiographie.
Communication au XIVe colloque de Médecine Nucléaire de langue Française. Tours, juin 1972.

FOURMAN P., ROYER P.
Calcium et tissu osseux. Biologie et Pathologie.
Sandoz Ed., (1970).

FRANCIS M.D.
The inhibition of calcium hydroxyapatite crystal growth by polyphosphonates and polyphosphates.
Calc. Tiss. Res., (1969), 3, 151.

FRANCIS M.D., RUSSELL R.G., FLEISCH H.
Diphosphonates inhibit formation of calcium phosphate crystals in vitro and pathological calcification in vivo.
Science, (1969), 165, 1264.

FRIEDMAN B.H., SIEGEL M.E., WAGNER H.N. Jr.
Breast uptake of ^{99m}Tc HEDSPA (Diphosphonate) : an indicator of breast carcinoma.
J. Nucl. Med., (1974), 15, 491, (ABST).

GABBIANI G.
Effect of phosphates upon experimental skin calcinosis.
Canadian J. Physiol. Pharmacol., (1966), 44, 203.

GABBIANI G., JACOMIN M.L., RICHARD P.M.
Soft tissue calcification induced by earth metals and its prevention by sodium pyrophosphate.
Br. J. Pharmac. Chem. (1966), 27, 1.

GARCIA J.H., KAMIJYO.
Cerebral infarction. Evolution of histopathological changes after occlusion of a middle cerebral artery in primates.
J. Neuropath Exp. Neurol., (1974), 33, 408.

GO P.T., CHIU C.L., DOTY D.B., CHANG H.F., CHRISTIE J.H.
Imaging of experimental myocardial contusion with Tc-^{99}m-Sn-polyphosphate.
J. Nucl. Med., (1974), 15, 494, (ABST.).

GONSETTE R.
Incidence clinique des troubles de la perméabilité capillaire cérébrale (Barrière Hématoencéphalique).
Masson & Cie, Ed., (1972), 175 pages.

GORE I., ARONS W.
Calcification of the myocardium.
Arch. Path., (1949), 48, 1.

GRAMES G.M., JANSEN C.
The abnormal bone scan in cerebral infarction.
J. Nucl. Med., (1973), 14, 941.

GREENAWALT J.W., ROSSI C.S., LEHNINGER A.L.
Effect of active accumulation of calcium and phosphate ions on the structure of rat liver mitochrondria.
J. Cell. Biol., (1964), 23, 21.

HAROLD F.M.
Inorganic polyphosphates in biology : structure, metabolism and function.
Bacteriol. Review, (1966), 30, 772.

HARPER P.V., LATHROP K.A., KRIZEK H., LEMBARES N., STARK V., HOFFER P.B.
Clinical feasibility of myocardial imaging with $^{13}NH_3$.
J. Nucl. Med. (1972), 13, 278.

HARPER P.V., AL-SADIR J., MAYORGA A., BEKERMAN C., GOLDBARG A., LEMBARES N., LATHROP K.
Demonstration of myocardial ischemia in images produced with intravenous $^{13}NH_3$.
J. Nucl. Med. (1973), 14, 406, (ABST.).

HARRIS W.H., JACKSON P.H., JOWSEY J.
The in vivo distribution of tetracyclines in canine bone.
J. Bone Jt surg., (1962), 44 A, 1308.

HAWTHORNE J.N., KAI M.
Metabolism of phosphoinositides.
In "Handbook of neurochemistry", Vol. 3, p. 491, Ed. by E. LAJTHA, Plenum Press, (1970).

HEBERT L.A., LEMANN J. Jr, PETERSEN J.B., LENNON E.J.
Studies of the mechanism by which phosphate infusion lowers serum calcium concentration.
J. Clin. Invest., (1966), 45, 1886.

HEGESIPPE M., BEYDON J., BARDY A., PANNECIERE C.
Stannous pyrophosphate labeled with technetium-99m for skeletal scintigraphy.
J. Nucl. Biol. Med., (1973), 17, 93.

HEPPEL L.A., HARKNESS D.R., HILMOE R.J.
A study of the substrate specificity and other properties of the alkaline phosphatase of Escherichia Coli.
J. Biol. Chem., (1962), 237, 841.

HERMANN G., HAUPT G.J., BIRKHEAD N.C.
Rapid myocardial calcification after cardiac surgery.
JAMA, (1963), 186, 260.

HOLMAN B.L., DEWANJEE M.K., IDOINE J., FLIEGEL C.P., DAVIS M.A., TREVES S., ELDH P.
Detection and localization of experimental infarction with ^{99m}Tc-tetracycline.
J. Nucl. Med., (1973), 8, 595.

HOLMAN B.L., LESCH M., ZWEIMAN F., TEMTE J., DEWANJEE M.K., LOWN B., GOPLIN R.
Detection, localization and sizing of acute myocardial infarcts.
J. Nucl. Med., (1974), 15, (ABST.).

HOLMAN B.L., LESCH M., ZWEIMAN F.G., TEMTE J., LOWN B., GOPLIN R.
Detection and sizing of acute myocardial infarcts with ^{99m}Tc (Sn) tetracycline.
N. Engl. J. Med., (1974), 291, 159.

HOSSMANN K.A.
Morphological substrate of the blood-brain barrier in human brain tumors.
In "Brain Edema", (1967), Klatzo I. et Seitelberger R., Springer Verlag Ed. New-York.

HOWELL D.S., PITA J.C., MARQUEZ J.F., MADRUGA J.E.
Partition of calcium, phosphate and protein in the fluid phase aspirated at calcifying sites in epiphyseal cartilage.
J. Clin. Invest., (1968), 47, 1121.

IBRAHIM M.Z.
The response of the brain to hypoxia and ischemia.
J. Neurol. Sci., (1972), 17, 271.

IRVING J.T., SCHIBLER D., FLEISCH H.
Bone formation in normal and vitamine D-treated rachitic rats during the administration of polyphosphates.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., (1966),123, 332.

ISITMAN A.T., KOMAKI S., HOLMES P.A.
A benign uptake of ^{99m}Tc-polyphosphate after radical mastectomy.
Radiology, (1974), 110, 159.

JENNINGS R.B., HERDSON P.B., SOMMERS H.M.
Structural and functional abnormalities in mitochondria isolated from ischemic dog myocardium.
Lab. Invest., (1969), 20, 548.

JENNINGS R.B., GANOTE C.E.
Structural changes in myocardium during acute ischemia.
Circul. Res., (1974), 35, suppl. III, 156.

JONES A.E., FRANKEL R.S., Di CHIRO G., JOHNSTON G.S.
Brain scintigraphy with ^{99m}Tc-pertechnetate, polyphosphate, and ^{67}Ga-citrate.
J. Nucl. Med., (1973), 14, 413, (ABST.).

JONES A.E., FRANKEL R.S., Di CHIRO G., JOHNSTON G.S.
Brain scintigraphy with ^{99m}Tc-pertechnetate, ^{99m}Tc-polyphosphate and ^{67}Ga citrate.
Radiology, (1974), 112, 123.

JOWSEY J., HOLLEY K.E., LINMAN J.W.
Effect of sodium etidronate in adult cats.
J. Lab. Clin. Med., (1970),76, 126.

JOWSEY J., PIGGS B.L., KELLY P.J., HOFFMAN D.L., BORDIER P.
The treatment of osteoporosis with disodium ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate.
J. Lab. Clin. Med., (1971), 78, 574.

JOWSEY J., HOLLEY K.E.
Influence of diphosphonate on progress of experimentally induced osteoporosis.
J. Lab. Clin. Med., (1973), 82, 567.

JUNG A., RUSSELL P.G., BISAZ S., MORGAN D.P., FLEISCH H.
Fate of intravenously injected pyrophosphate-^{32}P in dogs.
Am. J. Physiol., (1970), 218, 1757.

KANG G.S.
Potential value of toluidine blue analogs as scintiscanning agents for myocardial infarcts.
J. Nucl. Med., (1969), 10, 413, (ABST.).

KANTOR S.M.
Preoperative differentiation of benign and malignant gastric lesions by tetracycline induced fluorescence.
Bull. Sinai Hosp. Detroit, (1961), 9, 66.

KAPLAN G.
Le pyrophosphate et ses homologues. Pôle dans le métabolisme phosphocalcique et la physiologie osseuse.
Can. Med., (1972), 13, 13.

KATZ A.M., REPKE D.I.
Quantitative aspects of dog cardiac microsomal calcium binding and calcium uptake.
Circul. Res., (1967), 21, 153.

KHATTAB F.I.
Alterations in acid phosphatase bodies (Lysosomes) in cat motoneurons after asphyxiation of the spinal cord.
Exptl. Neurol., (1967), 18, 133.

KING W.R., FRANCIS M.D., MICHAEL W.R.
Effect of disodium ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate on bone formation.
Clin. Orthop. (1971), 78, 251.

KLAUS W.
Mouvements fonctionnels des electrolytes du myocarde.
Triangle, (1972), 12, 121.

KLEMPERER F.W., MILLER J.M., HILL C.J.
The inhibition of alkaline phosphatase by beryllium.
J. Biol. Chem., (1949), 180, 281.

KRAMER R.J., GOLDSTEIN R.E., HIRSHFELD J.W., JOHNSTON G.S., EPSTEIN S.E.
Visualization of acute myocardial infarction (AMI) by the radionuclide Gallium-67.
Circulation, (1972), 46, (suppl. II), 20.

KRISHNAMURTHY G.T., TUBIS M., ENDOW J.S., SINGPI V., WALSH C.F., BLAHD W.H.
Clinical comparison of the kinetics of ^{99m}Tc-labeled polyphosphate and diphosphonate.
J. Nucl. Med., (1974), 15, 848.

LAJTHA A.
Protein metabolism of the nervous system.
Internat. Rev. Neurobiol., (1964), 6, 1.

LAMB J.F., BAKER G.A., KHENTIGAN A., WINCHELL H.S.
Rubidium-81 for myocardial imaging.
Proceedings of the 1st World Congress of Nuclear Medicine, (1974), Tokyo.

LAZDUNSKI C., LAZDUNSKI M.
Etude cinétique du mécanisme d'action catalytique de la phosphatase alcaline d'Escherichia Coli.
Biochim. Biophys. Acta, (1966), 113, 551.

LEE J.C., BAKAY L.
Ultrastructural changes in the edematous central nervous system.
1 - Triethyltin edema.
Arch. Neurol., (1965), 13, 48.

LEE J.C., BAKAY L.
Ultrastructural changes in the edematous central nervous system.
2 - Cold induced edema.
Arch. Neurol. (1966), 14, 36.

LEE J.C.
Comparative studies on the ultrastructure of intracranial tumors in man and experimental animals.
In "Brain tumor scanning with radioisotopes"., (1969), Bakay L., Thomas C. C. Ed., Springfield Ill., p. 63.

LEHNINGER A.L., POSSI C.S., GREENAWALT J.W.
Respiration-dependant accumulation of inorganic phosphate and Ca^{++} by rat liver mitochondria.
Biochem. Biophys. Res. Comm., (1963), 10, 444.

LEHNINGER A.L.
Mitochondria and calcium ion transport.
Biochem. J., (1970), 119, 129.

LEHNINGER A.L.
Ca^{2+} transport by mitochondria and its possible role in the cardiac contraction-relaxation cycle.
Circul. Res., (1974), 35, suppl. III, 83.

LEONARD F., SCULLIN R.I.
New mechanism for calcification of skeletal tissues.
Nature, (1969), 224, 113.

LEONARD F., WADE C.W., HEGYELI A.F.
Mechanism of calcification.
Clin. Orthop., (1971), 78, 168.

LEVINE S.
Anoxic-ischaemic encephalopathy in rats.
Am. J. Path., (1960), 36, 1.

LOVE W.D., ISCHIHARA Y., LYON L.D., SMITH P.O.
Differences in the relationships between coronary blood flow and myocardial clearance of isotopes of potassium, rubidium and cesium.
Am. Heart J., (1968), 76, 353.

MALEK P., KOLC J., ZASTAVA V. et coll.
Fluorescence of tetracycline analogs fixed in myocardial infarction.
Cardiologia, (1963), 42, 303.

MARTIN J.H., MATTHEWS J.L.
Mitochondrial gravity in chrondrocytes, osteoblasts and osteocytes.
Clin. Orthop. (1970), 68, 273.

MATHEWS T., MOOSSY J.
Gliomas containing bone and cartilage.
J. Neuropath. Exp. Neurol., (1974), 33, 456.

MATSUI K., ILIO M., CHIBA K., YAMADA H., ABE M.
Diagnostic aide for the differential diagnosis of brain tumor and CVD by using ^{99m}Tc-pyrophosphate.
Proceedings of the 1st World Congress of Nuclear Medicine, (1974), Tokyo.

McGEEHAN J.T., RODRIGUEZ-ANTUNEZ A., LEWIS R.C.
Cesium 131 photoscan-aid in the diagnosis of myocardial infarction.
JAMA, (1968), 204, 585.

McLEAY J.F.
The use of systemic tetracyclines and ultraviolet in cancer detection.
Am. J. Surg., (1958), 96, 415.

McRae J., SUGAR R.M., SHIPLEY B., HOOK G.R.
Alterations in tissue distribution of ^{99m}Tc-pertechnetate in rats given stannous tin.
J. Nucl. Med., (1974), 15, 151.

MERONEY W.H., ARNEY G.K., SEGAR W.E., BALCH M.H.
The acute calcification of traumatized muscle, with particular references to acute post-traumatic renal insufficiency.
J. Clin. Invest., (1957), 36, 825.

MEYER S.L., PARKEY R.W., BONTE J.F., ATKINS J.M., CURRY G.C., WILLERSON J.T.
Technetium-99m stannous pyrophosphate myocardial scans in the diagnosis of acute myocaridal infarction in patients.
Clin. Research, (1974), 22, 290 A.

MICHAEL W.R., KING W.R., FRANCIS M.D.
Effectiveness of diphosphonates in preventing "osteoporosis" of disuse of the rat.
Clin. Orthop., (1971), 78, 271.

MILCH R.A., RALL D.P., TOBIE J.E.
Fluorescence of tetracycline antibiotics in bone.
J. Bone Jt. Surg., (1958), 40 A, 897.

MIYOSHI H.
Experimental striatal necrosis induced by sodium azide. A contribution to the problem of selective vulnerability and histochemical studies of enzymatic activity.
Acta Neuropath., (1967), 9, 199.

MOE O.A., BUTLER L.G.
Yeast inorganic pyrophosphatase.
II - Kinetics of Mg^{++} activation.
J. Biol. Chem., (1972), 247, 7308.

MOE O.A., BUTLER L.G.
Yeast inorganic pyrophosphatase.
III - Kinetics of Ca^{++} inhibition.
J. Biol. Chem., (1972), 247, 7415.

MOOPE C.L., STRASBERG P.M.
Cytochromes and oxidative phosphorylation.
In "Handbook of neurochemistry"., Vol. 9, p. 53,
Ed. by E. Lajtha, Plenum Press, (1970).

MORETTI J.L., MATHIEU E., ESCAIG F., DEGOS J.G.
Pyrophosphates de ^{99m}Tc et scintigraphie cérébrale.
Nouv. Presse Med., (1974), 3, 679.

MOSS D.W., EATON R.H., SMITH J.K., WHITBY L.G.
Association of inorganic-pyrophosphatase activity with human alkaline-phosphatase preparations.
Biochem. J., (1967), 102, 53.

MOSS D.W.
The influence of metal ions on the orthophosphatase and inorganic pyrophosphatase activities of human alkaline phosphatase.
Biochem. J., (1969), 112, 699.

MYERS R.W., GOLDSTEIN P.E.
Radioisotopic assessment of myocardial infarction.
N. Engl. J. Med., (1974), 291, 203.

NICHOLS G. Jr, FLANAGAN B., VAN DER SLUYS VEER J.
Distorsions of bone cell metabolism in uremia and their cause.
Arch. Intern. Med., (1969), 124, 530.

NYSTROM S.
Pathological changes in blood vessels of human glioblastoma multiforme. Comparative studies using plastic casting, angiography, light microscopy, and electron microscopy, and with reference to some other brain tumors.
Acta Pathol. Microbiol. Scand., (1960), 49, (Suppl. 137).

OTOMO E., MICHAELIS M.
Penetration of radioactive phosphorus into normal and shocked rats brain.
Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.), (1960), 104, 259.

PAPAVASILIOU C., KOSTAMIS P., ANGELAKIS P., CONSTANTINIDES C.
Localization of ^{87m}Sr in extra-osseous tumors.
J. Nucl. Med., (1971), 12, 265.

PARFITT A.D.
Soft tissue calcification in uremia.
Arch. Intern. Med., (1969), 124, 544.

PARKEY R.W.
Communication personnelle, (1974).

PARKEY R.W., BONTE F.J., MEYER S.L., WILLERSON J.T., ATKINS J.M., CURRY G.C.
Detection of acute myocardial infarction in humans using 99mTc stannous pyrophosphate (PYP).
J. Nucl. Med., (1974), 15, 521 (ABST.).

PARKEY R.W., BONTE F.J., MEYER S.L., ATKINS J.M., CURRY G.L., STOKELY E.M., WILLERSON J.T.
A new method for radionuclide imaging of acute myocardial infarction in humans.
Circulation, (1974), 50, 540.

PENDERGRASS H.P., POTSAID M.S., CASTPONOVO F.P.
The clinical use of 99mTc-diphosphonate (HEDSPA). A new agent for skeletal imaging.
Radiology, (1973), 107, 557.

PERKINS H.R., WALKER P.G.
The occurence of pyrophosphate in bone.
J. Bone Jt. Surg., (1958), 40 B, 333.

PHILIPS J.W., COBB E.G., RICHARDS V. et coll.
The deposition and retention of tetracycline in cancer.
Am. J. Surg., (1960), 100, 384.

PLANIOL T.
Gamma-encéphalographie.
Encyclopédie Médico-chirurgicale, (1971), 9, 31668-C10.

PLANIOL T., GARNIER G., ITTI R., BROCHIER M.
La triscintigraphie cardiaque.
J. Biol. Med. Nucl., (1971), 25, 17.

PLANIOL T.
La scintigraphie en cardiologie.
Communication au XIVe colloque de Médecine Nucléaire de langue Française, Tours, juin 1972.

POE N.D.
Comparative myocardial uptake and clearance characteristics of potassium and cesium.
J. Nucl. Med., (1972), 13, 557.

POE N.D., EBER L.M., GRAHAM L.S., MacDONALD N.S.
Evaluation of ^{43}K and ^{129}Cs for myocardial imaging.
J. Nucl. Med., (1973), 14, 440, (ABST.).

POE N.D., ROBINSON G.D., MacDONALD N.S.
Myocardial extraction of variously labeled fatty acids and carboxylates.
J. Nucl. Med., (1973), 14, 440, (ABST.).

POE N.D., EBER L.M., GRAHAM L.S., NIKESCH W., MacDONALD N.S.
A critical evaluation of potassium-43 and cesium-129 for quantitative myocardial scanning.
IAEA, SM-164, 132.

PONTEN U.
Cerebral energy metabolism.
J. Neurosurg. Sci., (1973), 17, 213.

POSEN S.
Alkaline phosphatase.
Annals Int. Med., (1967), 67, 183.

PROCKOP D.J.
The intracellular biosynthesis of collagen. Some possible implications for diseases of bone and other connective tissues.
Arch. Intern. Med., (1969), 124, 563.

PULLMAN M.E., SCHATZ G.
Mitochondrial oxidations:and energy coupling.
Ann. Rev. Biochem. (1967), 36, 562.

RAIMONDI A.J.
Localization of radio-iodinated serum albumin in human glioma.
An electron-microscopic study.
Arch. Neurol., (1964), 11, 173.

RAIMONDI A.J.
Concentration of tracer substances in brain tumors : an electron microscopic evaluation.
In "brain tumor scanning with radioisotopes", (1969), L. Bakay, Thomas C.C., Ed., Springfield Ill., p. 37.

RALL D.P., LOU T.L., LANE M. et coll.
Appearance and persistence of fluorescent material in tumor tissue after tetracycline administration.
J. Natl. Cancer Inst., (1957), 19, 79.

REICHENBACH D.D., BENDITT E.P.
Myofibrillar degeneration. A response of the myocardial cell to injury.
Arch. Path., (1968), 85, 189.

REITEMEYER R., BUHPEP T.
The inhibiting action of minute amounts of sodium hexametaphosphate on the precipitation of calcium carbonate from ammoniacal solutions.
J. Phys. Chem., (1940), 44, 535.

REYNOLDS J.J.
Use of bone cultures in studying phosphate metabolism.
In "Phosphate et métabolisme phosphocalcique". (1970), Symposium International - Paris, Sandoz Ed., p. 47.

REYNOLDS J.J., MINKIN C., SPYCHER D., MORGAN D.B., FLEISCH H.
Effects of diphosphonates on bone resorption in tissue culture.
Calc. Tiss. Res., (1973).

RIDLINGTON J.W., BUTLER L.G.
Yeast inorganic pyrophosphatase.
I - Binding of pyrophosphate, metal ion, and metal ion-pyrophosphate complexes.
J. Biol. Chem., (1972), 247, 7303.

ROBINSON R.
The possible significance of hexosephosphoric esters in ossification.
Biochem. J., (1923), 17, 286.

ROBINSON G.D. Jr, POE N.D., LEE A.Y. SELIN C.S.
16-Iodo-9-Hexadecenoic acid : hign specific activity preparation and myocardial specicity.
J. Nucl. Med., (1974), 15, 528, (ABST.).

ROSS R.R.
Cardiopathies ischémiques.
In "Principes de médecine interne", (1972), HARRISON T.R., Flammarion Ed., p. 1220.

ROSSMAN D.J., SIEGEL M.B., FRIEDMAN B.H., STRAUSS H.W., PITT B.
Accumulation of 99mTc-glucoheptonate in acutely infarcted myocardium.
J. Nucl. Med., (1974), 15, 529, (ABST).

RUSSELL R.G.
Excretion of inorganic pyrophosphate in hypophosphatasia.
Lancet, (1965), 2, 461.

RUSSELL R.G., BISAZ S., FLEISCH H.
Pyrophosphate and diphosphonates in calcium metabolism and their possible role in renal failure.
Arch. Intern. Med., (1969), 124, 571.

RUSSELL R.G., SMITH R.
Diphosphonates - Experimental and clinical aspects.
J. Bone Jt Surg., (1973), 55B, 66.

SCHALL G.L., ZEIGER L., PRIMACK A., DeLELLIS R.
Uptake of Sr by an osteosarcoma metastatic to lung.
J. Nucl. Med., (1971), 12, 131.

SCHIBLER D., FLEISCH H.
Inhibition of skin calcification (calciphylaxis) by polyphosphates.
Experientia,(1966), 22, 367.

SCHIBLER D., RUSSELL R.G., FLEISCH H.
Inhibition by pyrophosphate and polyphosphate of aortic calcification induced by vitamin D3 in rats.
Clin. Sci., (1968), 35, 363.

SCHUSTER S.M., OLSON M.S.
Studies on the energy-dependent uptake of divalent metal ions by beef heart mitochondria.
J. Biol. Chem., (1974), 249, 7151.

SCHUSTER S.M., OLSON M.S.
The regulation of pyruvate deshydrogenase in isolated beef heart mitochondria. The role of calcium, magnesium and permeant anions.
J. Biol. Chem., (1974), 249, 7159.

SELVERSTONE B., MOULTON M.J.
The phosphorus metabolism of gliomas : A study with radioactive isotopes.
Brain, (1957), 80, 362.

SERAFINI A.N., WATSON D.D., NELSON J.P., SMOAK W.M.
Bone scintigraphy. Comparison of 99mTc-polyphosphate and 99mTc diphosphonate.
A paraître (1974).

SHEN A.C., JENNINGS R.B.
Myocardial calcium and magnesium in acute ischemic injury.
Am. J. Path., (1972), 67, 417.

SHEN A.C., JENNINGS R.B.
Kinetics of calcium accumulation in acute myocardial ischemic injury.
Am. J., Path., (1972), 67, 441.

SHIBASAKI H.
Electron microscope stydy of the rat brain with experimental sodium azide intoxication.
Acta Neuropath., (1969), 14, 185.

SOBEL B.E.
Salient biochemical features in ischemic myocardium.
Circul. Res., (1974), 35, suppl. III, 173.

SOLOMON R.D., NADKARNI B.B., RICHARDSON L.
Local calciphylaxis in dihydrotachysterol-sensitized rats.
Arch. Path., (1966), 82, 60.

SOODSMA J.F., NOPOLIE P.C.
Rat heart pyrophosphate phosphohydrolase activities. Sub-cellular distribution, catalytic properties, and hormonal responses.
Biochim., Biophys. Acta, (1966), 122, 510.

SOBEL B.E.
Salient biochemical features in ischemic myocardium.
Circul. Res., (1974), 35, suppl. III, 173.

STEVENSON J.S., DUNSON G.L.
Cardiac changes with 99mTc-Tin-Phosphate radiopharmaceuticals.
J. Nucl. Med., (1973), 14, 774.

STEVENSON J.S., ECKELMAN W.C., SORCCINSKI P.Z., REBA R.C., BARRON E.L., LEVIN S.G.
The toxicity of Sn-pyrophosphate : clinical manifestations prior to acute LD50.
J. Nucl. Med., (1974), 15, 252.

STOKELY E.M., PARKEY R.W., LEWIS S.E., BONTE F.J.
Improvement of 99mTc-stannous pyrophosphate myocardial scintigrams using computer processing.
J. Nucl. Med., (1974), 15, 536, (ABST.).

SUBRAMANIAN G., McAFEE J.G.
A new complex of Tc-99m for skeletal imaging.
Radiology, (1971), 98, 192.

SUBRAMANIAN G., McAFEE J.B., O'MARA R.E., ROSENSTREICH M., MEHTER A.
99mTc-polyphosphate PP46 : a new radiopharmaceutical for skeletal imaging.
J. Nucl. Med., (1971), 12, 399, (ABST.).

SUBRAMANIAN G., McAFEE J.G., BLAIR P.J.
Pharmaceutical toxicity as a function of biodegradability. (The author's reply).
J. Nucl. Med., (1973), 14, 719.

SUBRAMANIAN G., McAFEE J.G., BLAIR R.J., THOMAS F.D.
99mTc labeled phosphate compounds in nuclear medicine.
Communication à la XIIe réunion annuelle de la Société de Médecine Nucléaire Allemande. 11 - 14 septembre 1974.

SUTFIN L.V., HOLTROP M.E., OGILVIE R.E.
Microanalysis of individual mitochondrial granules with diameters less than 1000 Angströms.
Science, (1971), 174, 947.

TATOR C.H.
Factors involved in the uptake and distribution of radioactive tracers in brain tumors and brain. In "Brain tumor scanning with radio-isotopes"., (1969), Rakay L., p. 21.

TAVES D.R.
Mechanisms of calcification.
Clin. Orthop. (1965), 42, 207.

TERMINE J.D., POSNER A.S.
Infrared analysis of rat bone : age dependency of amorphous and crystalline mineral fractions.
Science, (1966), 153, 1523.

THOMAS W.C., Jr., TOMITA A.
Mineralization of human and bovine tissue in vitro.
Am. J. Path., (1967), 51, 621.

TILDEN R.L., JACKSON J. Jr, ENNEKING W.F., DELAND F.H., McVEY J.T.
99mTc-polyphosphate : histological localization in human femurs by autoradiography.
J. Nucl. Med., (1973), 14, 576.

TOFE A.J., FRANCIS M.D.
In vitro optimization and organ distribution studies in animals with the bone scanning agent 99mTc-Sn-EHDP.
J. Nucl. Med. (1972), 13, 472, (ABST.).

TOFE A.J., FRANCIS M.D.
Optimization of the ratio of stannous tin : ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate for bone scanning with 99mTc-pertechnetate.
J. Nucl. Med., (1974), 15, 69.

TOW D.E., WAGNER H.N. Jr.

Scanning for tumors of brain and bone. Comparison of sodium pertechnetate-Tc99m and ionic strontium-87m.

UNEMOTO T., TANAKA M., HAYASHI M.
Effect of free magnesium and salts on the inorganic pyrophosphatase purified from a slightly halophilic vibrio alginolyticus.
Biochim. Biophys. Acta, (1973), 327, 490.

URIST M.R., MEYER H.P., MERICKEL K.S.
Calcium transport and calcification studies by microperfusion.
Clin. Orthop., (1971), 147, 41.

VALLEJO C.G., MARCO R., SEBASTIAN J.
The glucose 6-phosphate metabolic crossroads in brain. Studies at the enzyme level.
Arch. Biochem. Biophys., (1971), 147, 41.

VASINGTON F.D., MURPHY J.V.
Ca^{++} uptake by rat kidney mitochondria and its dependance on respiration and phosphorylation.
J. Biol. Chem., (1962), 237, 2670.

VILLARET, CACHERA.
Les embolies cérébrales : étude de pathologie expérimentale sur les embolies solides et gazeuses du cerveau.
(1939), Masson et Cie, Ed., Paris, 1 vol.

WEINSTOCK K.A., KING P.C., WUTHIER R.E.
The ion-binding characteristics of reconstituted collagen.
Biochem. J., (1967), 102, 983.

WEISSLER AM.M; KRUGER F.A., BABA N., SCARPELLI D.G., LEIGHTON R.F., GALLIMORE J.K.
Role of anaerobic metabolism in the preservation of functional capacity and structure of anoxic myocardium.
J. Clin. Invest. (1968), 47, 403.

WENZEL W.W., HEASTY R.G.
Uptake of 99mTc-stannous polyphosphate in an area of cerebral infarction.
J. Nucl. Med., (1974), 15, 207.

WHEREAT A.F., HULL F.E., ORISCHIMO M.W., RABINOWITZ J.L.
The role of succinate in the regulation of fatty acid synthesis by heart mitochondria.
J. Biol. Chem., (1967), 242, 4013.

WHITMORE W.F., BUSH I.M., ESQUIVEL E.
Tetracycline ultraviolet fluorescence in bladder carcinoma.
Cancer, (1964), 17, 1528.

WOLTGENS J.H., BONTING S.L., BIJVOET O.L.
Relationship between alkaline phosphatases, inorganic pyrophosphatase and L-ascorbic acid in calcifying hamster molars.
Clin. Orthop., (1971), 78, 296.

WOOD E.H., HEPPNER R.L., WEIDMANN S.
Inotropic effects of electric currents.
Circul. Res., (1969), 24, 409.

YAMAMOTO T.
The cerebral distribution and migration of radioisotopes with special reference to autoradiograms.
J. Neuropath. Exp. Neurol., (1959), 18, 418.

YANO Y., VAN DYKE D., BUDINGER T.F., ANGER H.O., CHU P.
Myocardial uptake studies with 129 Cs and the scintillation camera.
J. Nucl. Med., (1970), 11, 663.

YANO Y., McRAE J., VAN DYCKE D.C., ANGER H.O.
99mTc-labeled Sn (II) - Diphosphate : a bone scanning agent.
J. Nucl. Med., (1972), 13, 480, (ABST.).

YANO Y., McRAE J., VAN DYCKE D.C., ANGER H.O.
Technetium-99m-labeled stannous ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate : a new bone scanning agent.
J. Nucl. Med. (1973), 14, 73.

YEH En-Lin.
Extraosseous tumor uptake of 85Sr and 67Ga.
J. Nucl. Med., (1974), 15, 361.

ZIMMER A.M., ISITMAN A.T., SCHMITT G.H., HOLMES P.A.
Enzymatic inhibition by diphosphonate : a proposed mechanism of tissue uptake.
J. Nucl. Med., (1974), 15, 546, (ABST.).

ZWEIMAN F.G., O'KEEFE A., IDOINE S., CAMIN L.L., HOLMAN B.L.
Selective uptake of 99mTc-chelates and 67 Ga in acutely infarcted myocardium.
J. Nucl. Med., (1974), 15, 546, (ABST.).

Instaprint - 47, rue J.-Charpentier - Tours